



Universidade de Aveiro Departamento de Química
Ano 2012

**Diogo Figueiredo
Pinho**

**O Microbioma do Solo: Influência do Estado
Fitossanitário do Sobreiro**



**Diogo Figueiredo
Pinho**

**O Microbioma do Solo: Influência do Estado
Fitossanitário do Sobreiro**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, realizada sob a orientação científica da Doutora Conceição Egas, Diretora da Unidade de Serviços Avançados de Sequenciação do Biocant e Doutora Isabel Henriques, Investigadora de Pós-Doutoramento do CESAM da Universidade de Aveiro.

O júri

Presidente

Prof. Doutor António Carlos Matias Correia
Professor Catedrático do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Doutora Maria Conceição Venâncio Egas
Diretora da Unidade de Serviços Avançados de Sequenciação do Biocant

Doutora Isabel da Silva Henriques
Investigadora de Pós-Doutoramento do CESAM da Universidade de Aveiro

Doutor Newton C. Marcial Gomes
Investigador Assistente do CESAM da Universidade de Aveiro

Agradecimentos

Em primeiro lugar agradeço aos meus pais e familiares pelo esforço e paciência que tiveram para comigo, oferecendo-me a oportunidade de estudar numa “universidade de excelência”.

À Doutora Conceição Egas e à Doutora Isabel Henriques um muito obrigado, pois sem a sua ajuda e sem os seus conhecimentos tudo isto não teria sido possível para mim. Mais uma etapa concluída, venha a próxima.

Não poderia esquecer de agradecer ao pessoal do Biocant, nomeadamente Paula Gomes e Cristina Barroso da Unidade de Serviços Avançados de Sequenciação, Miguel Monsanto e Filipe Santos da Unidade de Bioinformática e Cátia Pinto, Remy Cardoso e Doutora Catarina Gomes da Unidade de Genómica.

Agradeço também a todas as pessoas do Laboratório de Microbiologia da Universidade de Aveiro pela agradável receção e ajuda na realização da DGGE, nomeadamente ao Professor Doutor António Correia e à Susana Araújo.

Agradeço às Engenheiras Conceição Santos Silva e Mariana Ribeiro Telles da Associação de Produtores Florestais do Concelho de Coruche e Limítrofes pela disponibilidade e ajuda que tiveram na recolha das amostras utilizadas neste trabalho.

E por fim agradeço aos meus amigos Patrícia Freitas, Ana Luísa Pinto, Diogo Queirós, Teresa Mourão, Francisca Silva e André Lopes pelo caminho que percorremos juntos e que os laços fortes formados perdurem por muitos e bons anos.

palavras-chave

Sobreiro, Fitossanidade, Microbioma do Solo, DGGE, Pirosequenciação

resumo

Nas últimas décadas tem ocorrido um declínio extensivo das espécies de *Quercus sp.* ao longo da Europa Central e Bacia do Mediterrâneo, induzida por uma série de fatores bióticos e abióticos. De forma a compreender qual o impacto do estado fitossanitário da espécie *Quercus suber* na população dos microrganismos do solo, foi efetuada a caracterização e comparação do microbioma do solo de sobreiros saudáveis e doentes.

Para isso, o DNA total da comunidade microbiana de dezasseis amostras de solo, provenientes de sobreiros saudáveis e sobreiros decrépitos, foi extraído e as sequências dos genes do rRNA 16S (bactérias) e do “Internal Transcribed Spacer II” (fungos) foram amplificadas por PCR. Inicialmente foi utilizada a DGGE como abordagem preliminar para comparação e agrupamento das amostras. De seguida, as amostras selecionadas foram sequenciadas na plataforma 454 da Life Sciences (Roche) de forma a detalhar a estrutura e composição do microbioma associado a cada estágio de saúde do sobreiro, assim como comparar as populações de microrganismos presentes nestas duas condições. Os resultados revelaram que ambas as comunidades microbianas apresentavam uma elevada diversidade de espécies, verificando-se nas comunidades bacterianas e fúngicas uma predominância dos filos *Proteobacteria* e *Basidiomycota*, respetivamente. Na análise funcional do grupo dos fungos foram detetadas várias espécies de cogumelos, ectomicorrizas, fungos saprófitas e produtores de antibióticos, e nas bactérias verificou-se a presença de microrganismos que participam no ciclo do azoto, produtoras de antibióticos, produtoras de ácido láctico e promotoras do crescimento das plantas. Na comparação do microbioma do solo de árvores saudáveis e decrépitas não foram observadas diferenças significativas para os dois grupos de microrganismos. Desta forma foi demonstrado que os exsudatos libertados pelas raízes não alteram significativamente a composição das comunidades microbianas presentes no solo livre de raízes.

No entanto, este trabalho possibilitou um avanço na compreensão da estrutura e composição das comunidades microbianas do solo de sobreiros, permitindo desta forma a caracterização global dos microrganismos presentes no solo do montado.

keywords

Cork Oak, Plant Health, Soil Microbiome, DGGE, 454 Pyrosequencing

abstract

In recent decades there has been an extensive decay of *Quercus sp.* in Central Europe and the Mediterranean Basin induced by a complex series of biotic and abiotic factors. In order to understand the impact of *Quercus suber* health state in soil microbiome, a characterization and comparison of soil from healthy and diseased cork oak trees was performed.

For this, total DNA of the microbial community of sixteen soil samples from healthy and decrepit cork oaks was extracted and the 16S rRNA genes (bacteria) and "Internal Transcribed Spacer II" (fungi) were amplified by PCR. Initially DGGE was used as a preliminary approach for comparing and clustering samples. The selected samples were sequenced on the 454 platform of the Life Sciences (Roche) to detail the structure and composition of the microbiome associated with each health stage of the cork oak, so as to compare the populations of microorganisms present in these two conditions.

The results demonstrated a high diversity of species for both microbial communities, revealing a predominance of the *Proteobacteria* and *Basidiomycota* phyla for bacterial and fungal communities, respectively. After functional analysis, in the fungi group, species of mushrooms, ectomycorrhizae, saprophytic and antibiotic-producing fungi were detected and in the bacteria group, microorganisms that participate in the nitrogen cycle, antibiotic producing, lactic acid producing and plant-growth promoting bacteria were found. There were no significant differences between soil microbiome of healthy and diseased trees in the two microorganism groups. It was thus demonstrated that exudates released by the roots do not modify significantly the microbial composition present in the bulk soil.

However this work has enabled a breakthrough in understanding the structure and composition of microbial communities in cork oaks soil, allowing a comprehensive characterization of soil microorganisms in the "montados".

Índice

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Introdução	2
1.2	<i>Quercus suber L.</i>	4
1.3	Microbioma do Solo	6
1.4	Métodos de Análise Molecular	7
1.5	Eletroforese em Gel por Gradiente de Desnaturação (DGGE)	9
1.6	Pirosequenciação	11
1.7	Bioinformática	15
1.8	Objetivos do Trabalho	17
2	MÉTODOS	19
2.1	Recolha das Amostras de Solo.....	20
2.2	Análise Físico-Química do Solo	21
2.3	Extração das Células Microbianas do Solo.....	21
2.4	Extração do DNA da Comunidade Microbiana	21
2.5	Eletroforese em Gel com Gradiente de Desnaturação	23
2.5.1	Análise dos Dados	25
2.6	Pirosequenciação	25
2.6.1	Processamento dos Dados	27
2.6.2	Análise dos Dados	28
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
3.1	Parâmetros Físico-Químicos do Solo	30
3.2	Extração do DNA.....	30
3.3	DGGE	31
3.4	Pirosequenciação	37
3.4.1	Análise da Riqueza Microbiana.....	41
3.4.2	Distribuição Taxonómica	43
3.4.3	Comparação dos Microbiomas do Solo.....	48
4	CONCLUSÕES	53
5	BIBLIOGRAFIA	55
6	ANEXOS	i

Índice de Figuras

Figura 1. Áreas dos povoamentos florestais por espécie de árvore dominante	2
Figura 2. Áreas de montado em Portugal por região	2
Figura 3. Evolução dos principais produtos exportados – Valor.....	3
Figura 4. Distribuição mundial das florestas de sobreiro	3
Figura 5. Evolução do estado fitossanitário do sobreiro, de acordo com a classe de decrepitude.....	5
Figura 6. Alguns marcos importantes na história da genómica e da sequenciação de DNA	7
Figura 7. Fluxograma das etapas para a análise da comunidade microbiana utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR) e eletroforese em gel por gradiente de desnaturação (DGGE).....	9
Figura 8. Aumento da capacidade de geração de dados por corrida e plataformas de sequenciação lançadas na última década	11
Figura 9. Representação esquemática dos produtos da biblioteca de amplicões.....	12
Figura 10. Esquema representativo dos passos para construção da biblioteca de “beads” com DNA amplificado que serão carregadas na placa de sequenciação	13
Figura 11. Cascata de reações enzimáticas que originam a produção de luz, processo necessário para este tipo de sequenciação	14
Figura 12. A luz gerada pela cascata de reações enzimáticas é gravada como uma serie de picos denominada pirograma	14
Figura 13. Esquema geral da “pipeline” de classificação automática implementada na Unidade de Bioinformática do Biocant (Cantanhede, Portugal) para o processamento de dados gerados na sequenciação em projetos de análise de rDNA.	16
Figura 14. Local de recolha das amostras de solo. As amostras foram recolhidas na Herdade dos Trabalhos, Coruche, Portugal	20
Figura 15. Esquema da zona de amostragem	20
Figura 16. Gel de agarose (1%) obtido após a amplificação por PCR da região V6	30
Figura 17. Géis de agarose (1%) dos produtos de PCR obtidos para DGGE.....	31

Figura 18. Géis de agarose (1%) dos produtos de PCR do triplicado 6.1D após diluição de 1:1, 1:10 e 1:100	32
Figura 19. Perfis de DGGE obtidos das amostras de solo de sobreiros	32
Figura 20. Dendrogramas construídos a partir dos perfis genéticos obtidos usando o coeficiente de Pearson e o UPGMA para agrupamento das amostras.....	33
Figura 21. Influência da zona de recolha no agrupamento dos perfis de DGGE das amostras de solo de sobreiros saudáveis e de sobreiros decrépitos	35
Figura 22. Análise por componentes principais demonstrando uma clara separação entre perfis genéticos adquiridos por DGGE para a região V6 e ITS II.....	36
Figura 24. Seleção das amostras a sequenciar através da análise por componentes principais	37
Figura 25. Géis de agarose (1%) dos produtos de PCR obtidos na construção das bibliotecas de amplicões para as regiões V6 e ITS II.....	38
Figura 26. Distribuição do número de sequências geradas na sequenciação para as regiões V6 e ITS II	38
Figura 27. Curvas de rarefação indicando o número de OTU observados pelo número de sequências obtidas, a uma distância filogenética de 3%	41
Figura 28. Árvore filogenética do domínio Bacteria, verificando-se uma elevada diversidade de microrganismos identificados nas amostras de árvores saudáveis e doentes	44
Figura 29. Abundância relativa dos grupos filogenéticos ao nível do filo das bactérias presentes nas amostras de solo	44
Figura 30. Árvore filogenética do domínio Fungi dos microrganismos identificados nas amostras de árvores saudáveis e doentes	46
Figura 31. Abundância relativa dos grupos filogenéticos ao nível do filo dos fungos presentes nas amostras de solo	46
Figura 32. Análise por componentes principais para comparação das populações de bactérias e fungos entre as amostras de solo de árvores saudáveis e doentes	50
Figura 33. Dendrogramas para comparação das populações de bactérias e fungos entre as amostras de solo de árvores saudáveis e doentes	51

Índice de Tabelas

Tabela 1. Sequência dos “primers” usados na amplificação por PCR	22
Tabela 2. Sequência dos “primers” usados na amplificação por PCR para análise por DGGE	23
Tabela 3. Resultados dos parâmetros físico-químicos do solo de árvores saudáveis e decrepitas	30
Tabela 4. Índices de Shannon, equitatividade e número de espécies calculados a partir dos perfis de DGGE.....	34
Tabela 5. Números gerados na sequenciação e processamento de dados para as amostras de solo de sobreiros saudáveis e decrepitos.....	40
Tabela 6. Estimativa do número de espécies esperado, espécies obtido e cobertura da diversidade por amostra e região amplificada através do estimador de riqueza Chao1. 42	
Tabela 7. Vinte e cinco géneros de fungos e bactérias predominantes nas amostras de solo de árvores saudáveis e doentes	47
Tabela 8. Microrganismos identificados nos diferentes níveis taxonómicos para o grupo das bactérias usando a ferramenta Metastats	48
Tabela 9. Microrganismos identificados nos diferentes níveis taxonómicos para o grupo dos fungos usando a ferramenta Metastats	49
Tabela 10. Sequências dos “primers” para a região V6 utilizados para a construção da biblioteca de amplicões na pirosequenciação	ii
Tabela 11. Sequências dos “primers” para a região ITS II utilizados para a construção da biblioteca de amplicões na pirosequenciação	iii

Abreviaturas

APS	Adenosina Fosfossulfato
ATP	Adenosina Trifosfato
DGGE	Eletroforese em Gel com Gradiente de Desnaturação
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo Trifosfato
emPCR	Reação de Polimerização em Cadeia de Emulsão
GC	Guanina e Citosina
ITS II	“Internal Transcribed Spacer II”
OTU	Unidade(s) Taxonómica(s) Operacional(is)
pb	Pares de Bases
PCA	Análise por Componentes Principais
PCR	Reação de Polimerização em Cadeia
PPi	Pirofosfato
RAPD	DNA Polimórfico Amplificado Aleatoriamente
rDNA	Genes que codificam para os RNAs ribossomais
RFLP	Polimorfismo do Tamanho do Fragmento de Restrição
RISA	Análise do Espaço Intergénico Ribossomal
RNA	Ácido Ribonucleico
TGGE	Eletroforese em Gel com Gradiente de Temperatura
Tris-EDTA	Tris(Hidroximetil)Aminometano - Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
UPGMA	“Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean”
V6	Região Hipervariável 6

1 INTRODUÇÃO

1.1 Introdução

De acordo com o 5º Inventário Florestal Nacional publicado em 2010 (AFN, 2010), cerca de 22.5% da área florestal é ocupada por sobreiros (Figura 1), estando estes maioritariamente localizados ao longo e a Sul do rio Tejo (Figura 2) (APCOR, 2011).

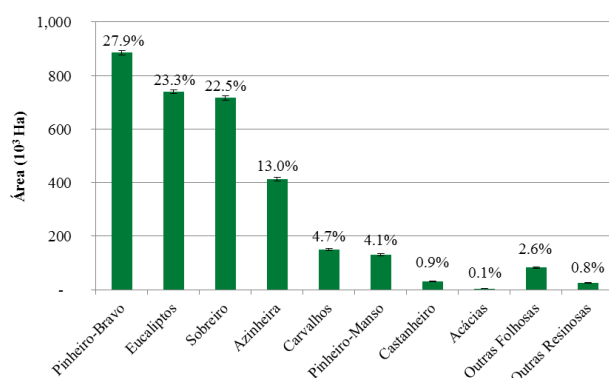


Figura 1. Áreas dos povoamentos florestais por espécie de árvore dominante (AFN, 2010).

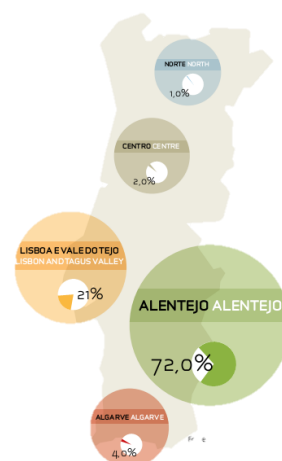


Figura 2. Áreas de montado em Portugal por região (APCOR, 2011).

No território português, o sobreiro tem as condições ideais para o seu desenvolvimento, sendo uma das espécies mais importantes em Portugal. As florestas de sobreiro, conhecidas como montados, são caracterizadas por uma diversidade de árvores onde o sobreiro é a espécie dominante, podendo também ser encontrados arbustos e sub-bosque herbáceo anual e outras árvores como azinheiras, pinheiros-bravos, etc. (Joffre *et al.*, 1999). Hoje em dia, estes ecossistemas mediterrânicos têm um elevado valor quer a nível social quer a nível económico, uma vez que geram cerca de 12000 postos de trabalho direto, 6500 empregos na área florestal e milhares de empregos indiretos relacionados com outros produtos do montado (gado, turismo, etc.). A partir do montado é possível extrair inúmeros produtos agroflorestais (Pinto-Correia *et al.*, 1999; Montero *et al.*, 2003; Pereira *et al.*, 2004), destacando-se a cortiça pelo seu impacto a nível económico. Este sector contribui anualmente para cerca de 2,3% do total das exportações nacionais e 30% de todas as exportações de produtos florestais portuguesa. A indústria da cortiça é um caso especial na economia portuguesa, pois é a única onde Portugal detém a primeira posição a nível mundial em diversas áreas (Mendes, 2002):

- 57% da produção mundial de cortiça em bruto;

- 60% da produção mundial de processamento de produtos de cortiça;
- Mais de dois terços das exportações mundiais em volume de produtos de cortiça.

Na Figura 3 são mostradas as principais aplicações da cortiça, podendo ser usada como material de construção, na moda e “design”, sendo maioritariamente utilizada na produção de rolhas de cortiça usadas no engarrafamento do vinho e de outros líquidos (Pereira, 2007).

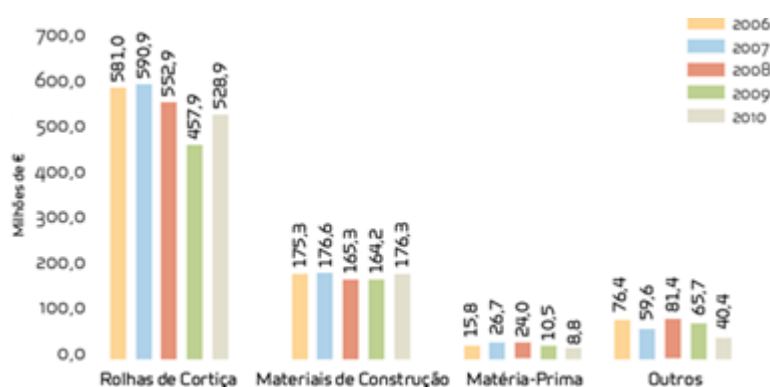


Figura 3. Evolução dos principais produtos exportados – Valor (Adaptado) (APCOR, 2011).

Como pode ser visto na Figura 4, o sobreiro é uma espécie típica da região do Mediterrâneo Ocidental, ocorrendo espontaneamente em Portugal (33%) e Espanha (23%), mas também no norte da Argélia (18%), Marrocos (15%) e Tunísia (4%). Há também áreas mais restritas como no sul da França (4%) e da costa ocidental da Itália (4%), incluindo a Sicília, Córsega e Sardenha (Pereira *et al.*, 2008). A área total que ocupa é de cerca de 1,43 milhões de hectares na Europa e 0,85 milhões de hectares no norte da África.

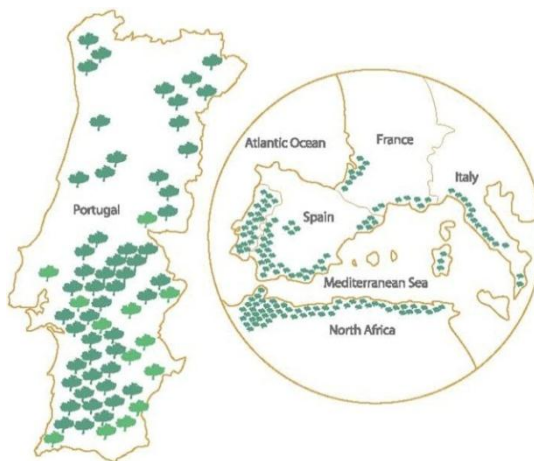


Figura 4. Distribuição mundial das florestas de sobreiro (Adaptado) (APCOR, 2011).

1.2 *Quercus suber* L.

O sobreiro (*Quercus suber* L.) está incluído na família do carvalho, sendo uma árvore de porte médio, com uma grande copa e altura média entre 15 a 20 m. O tronco tem uma casca espessa e suberosa, comumente conhecida como cortiça, fornecendo isolamento, o que ajuda a árvore a sobreviver a incêndios. Esta espécie é perenifólia, apresentando folhas verdes escuras, brilhantes na face superior e cinza na inferior, devido à presença de pelos. Os sobreiros desenvolvem um sistema radicular vertical, que pode ser dividido em camadas. As raízes finas da camada superior espalham-se a partir da raiz principal, estando imediatamente abaixo do nível do solo, numa profundidade de cerca de 30 cm. A segunda camada pode variar em profundidade e é formada em contacto com o curso mineral subjacente. Regra geral, a recolha da cortiça não é prejudicial para a árvore, uma vez que a cada 9 a 10 anos uma nova camada de cortiça com espessura idêntica é regenerada, sendo novamente submetida ao descortiçamento, podendo produzir entre 100 a 200kg de cortiça durante o seu tempo de vida. A espécie é caracterizada por necessitar de grandes quantidades de luz e calor, crescendo em zonas com uma temperatura média de 13 a 17 °C durante todo o ano. Suporta temperaturas máximas de até 40 °C, ocorrendo uma redução temporária do metabolismo, assim como temperaturas mínimas de -10 °C, sem que ocorram danos graves. *Q. suber* não tem grandes requisitos em relação ao solo, sendo capaz de crescer em locais arenosos e argilosos de origem granítica e xística, não sendo possível o seu desenvolvimento em solos calcários. O pH do solo deve estar entre os 4.5 e 7.0 e a quantidade ideal de precipitação situa-se entre 500 e 700 mm.

Nas últimas décadas tem-se observado um decaimento extensivo de *Quercus* sp. na Europa central e na bacia do Mediterrâneo (Barbero *et al.*, 1990; Führer, 1998). Esta situação tem sido discutida em vários estudos sugerindo um declínio brutal em vários montados induzido por uma série complexa de fatores bióticos e abióticos (Thomas *et al.*, 2002). Vários estudos apontam como principais causas os verões secos e extremamente quentes, contaminantes ambientais (Faria *et al.*, 1996; Faria *et al.*, 1998; Otieno *et al.*, 2006; David *et al.*, 2007), surtos prejudiciais de espécies de *Phytophthora* (incluindo a *Phytophthora cinnamomi*) (Brasier, 1996; Balci *et al.*, 2003; Balci *et al.*, 2003a; Moreira *et al.*, 2005) e danos nas sementes induzidos pelo pastoreio durante as últimas décadas (Campos *et al.*, 2008). No entanto as causas do declínio dos montados ainda não são

totalmente conhecidas porque a floresta é uma estrutura dinâmica complexa de grupos de árvores e vegetação associada (Ja *et al.*, 2011).

Em Portugal, no final do século dezanove, este evento também foi descrito (Almeida, 1898; Câmara-Pestana, 1898), tornando-se um problema importante devido ao elevado número de árvores que estavam a morrer, nomeadamente no Alentejo e Algarve, e pelo facto de Portugal deter cerca de 32% da área total de sobreiro a nível mundial. A Figura 5 mostra a evolução fitossanitária do sobreiro, dividindo-se esta em 4 classes de decrepitude. Numa árvore de classe 0 não se verifica qualquer sintoma de doença, apresentando-se esta robusta, vigorosa, esbelta e verdejante. Na classe 1, as árvores apresentam ramos secos, em especial os rebentos do ano, mantendo a robustez da classe 0, verificando-se apenas alguma perda de vigor. Nas classes 2 e 3 observa-se uma evidente decadência da árvore, apresentando uma desfolha intermédia ou alta na classe 2 e um total desfolhamento na classe 3. Nestas duas classes a árvore perde a sua robustez e vigor, exibindo um aspeto seco e decrepito.

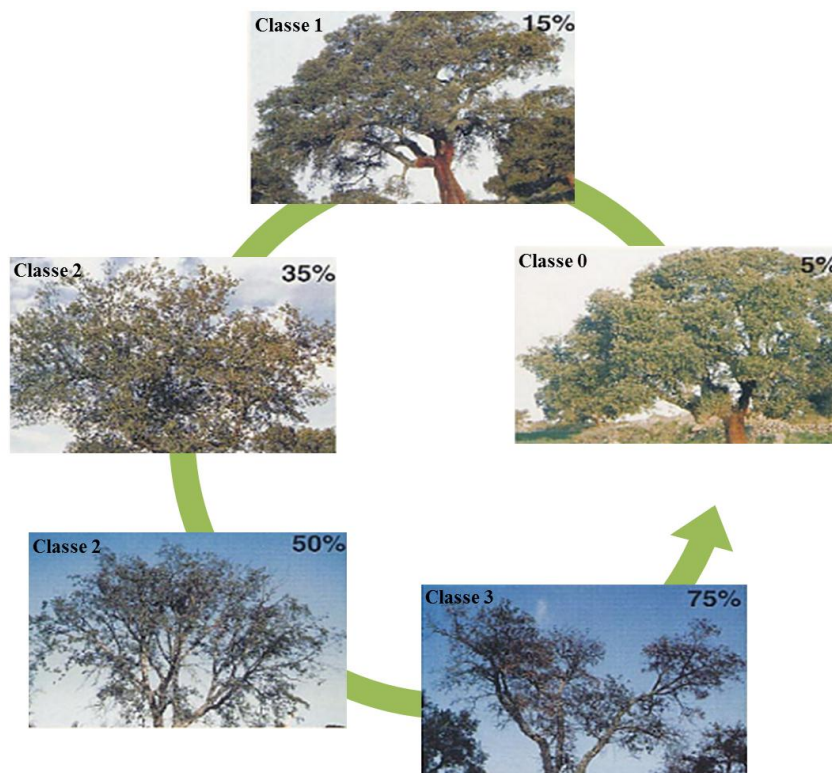


Figura 5. Evolução do estado fitossanitário do sobreiro, de acordo com a classe de decrepitude. As percentagens indicam o nível de desfolha.

Durante os anos 90, grupos portugueses e espanhóis realizaram estudos onde mostraram que as espécies de sobreiro e azinheiro eram suscetíveis à *Phytophthora cinnamomi* (Tuset *et al.*, 1996) e concluíram que o principal fator da morte dos sobreiros se devia a este fungo patogénico (Cobos *et al.*, 1993; Moreira *et al.*, 1993; Brasier *et al.*, 1993a; Brasier *et al.*, 1993b). Nos últimos 40 anos em muitos montados situados nas regiões do sul verificou-se um aumento da presença de *P. cinnamomi* com o tempo, sugerindo que a população deste patógeno esteja a aumentar consideravelmente (Moreira *et al.*, 2006).

1.3 Microbioma do Solo

O solo é considerado o habitat na Terra mais rico em termos de diversidade microbiana assim como no tamanho dessa comunidade. Em 1990 surgiu a primeira publicação onde foi estimada a abundância de procariotas no solo, tendo-se chegado a um valor de 4600 genomas distintos por grama de solo (Torsvik *et al.*, 1990). No entanto, estudos mais recentes mostraram que este número pode variar entre 2000 e 8,3 milhões (Gans *et al.*, 2005; Schloss *et al.*, 2006), sendo esta diversidade catalisada pela variação temporal dos fatores físico-químicos, como a temperatura, humidade e nutrientes. Os microrganismos do solo podem encontrar-se em diferentes micro-habitats, podendo estar presentes na superfície de agregados de partículas do solo e em espaços porosos entre e dentro dos agregados (Foster, 1988). Através de moléculas ou sinais específicos, eles interagem com o ambiente envolvente, tendo um papel fulcral em processos ambientais, tais como ciclos biogeoquímicos de nutrientes e de matéria e na manutenção da sanidade das plantas e da qualidade do solo (Lugtenberg *et al.*, 2009). A interação dos microrganismos com as raízes das plantas e constituintes presentes na interface raiz-solo torna esta interface um ambiente dinâmico conhecido como rizosfera (Lynch, 1990). A rizosfera pode ser definida como a porção de solo adjacente ao sistema radicular da planta e que é influenciada pelos exsudatos das raízes (Buyer *et al.*, 2002; Mukerji *et al.*, 2006). Esta região é rica em açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos, ácidos gordos e esteróis, vitaminas, nucleótidos entre outros compostos (Curl *et al.*, 1986). Esta mistura complexa de compostos orgânicos fornece fontes de carbono, azoto e outros nutrientes aos microrganismos, que juntamente com fatores físicos, químicos e biológicos podem influenciar a atividade e a estrutura da comunidade envolvente à rizosfera (Sørensen,

1997). Vários estudos têm mostrado que a rizosfera tem um grande efeito sobre as populações e comunidades de bactérias e fungos, estando estas presentes em maior densidade e diversidade quando comparadas com o solo onde não existem raízes (Maloney *et al.*, 1997; Semenov *et al.*, 1999). Para o estudo deste ambiente têm sido utilizadas diferentes técnicas. O cultivo e isolamento de microrganismos é o método tradicional, mas apenas 0,1 a 1,0% das bactérias são cultiváveis, perdendo-se grande parte da informação e portanto, a imagem formada não se aproxima da realidade (Staley *et al.*, 1985).

1.4 Métodos de Análise Molecular

Desde a descoberta da estrutura da dupla hélice de DNA ao desenvolvimento das técnicas de sequenciação de última geração tem ocorrido um grande desenvolvimento nos métodos de análise (Figura 6). Desta forma foi possível contornar algumas das limitações adjacentes aos métodos de isolamento e cultivo, tendo sido desenvolvidas abordagens moleculares (técnicas independentes de cultivo), para uma melhor caracterização e comparação das comunidades microbianas do solo (Nakatsu, 2004).

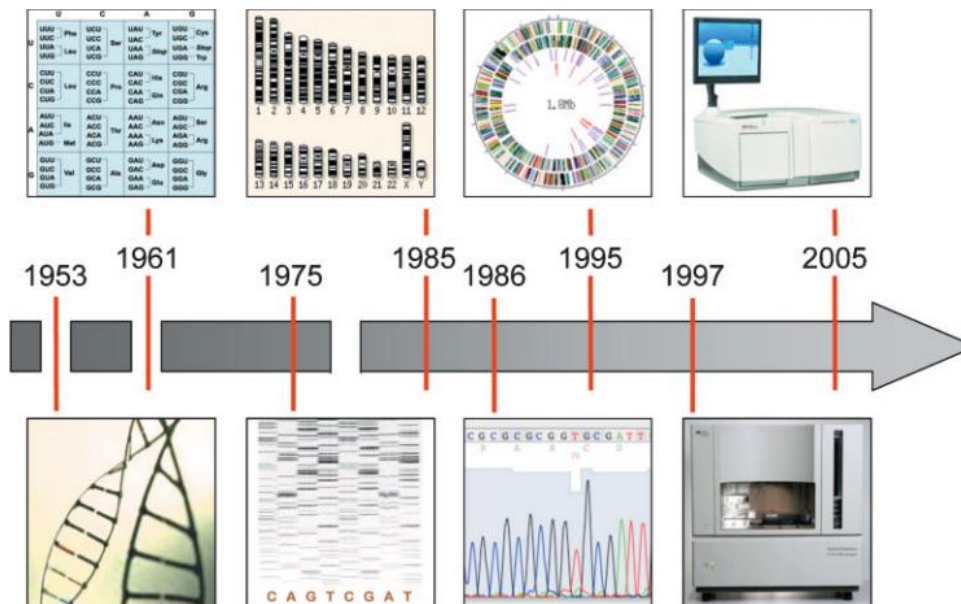


Figura 6. Alguns marcos importantes na história da genómica e da sequenciação de DNA. Em 1953 foi descoberta a estrutura da dupla hélice de DNA; 1961, foi dado o primeiro passo na decifração do código genético; 1975, método de sequenciação por interrupção da síntese da cadeia do ácido nucleico desenvolvido por Sanger; 1985, criado o consórcio internacional para sequenciar o genoma humano (Projeto Genoma Humano); 1986, aumento das capacidades de sequenciação pelo uso de fluoróforos; 1995, publicado o primeiro genoma microbiano por J.C. Venter e seus colaboradores; 1997, desenvolvimento e comercialização de sequenciadores capilares; 2005, desenvolvimento e comercialização do pirosequenciador GS20. (Adaptado) (Bertin *et al.*, 2008)

Estes métodos envolvem a lise das células presentes no solo, extração dos ácidos nucleicos e análise de sequências-alvo ou de toda a informação genética. As técnicas moleculares disponíveis para o estudo de comunidades microbianas dividem-se em dois principais tipos (Ranjard *et al.*, 2000):

- Análise completa do DNA da comunidade: ferramentas moleculares que permitem analisar toda a informação genética a partir do DNA extraído;
- Análise parcial do DNA da comunidade: ferramentas moleculares que normalmente analisam parte da informação, onde determinadas sequências dos genomas são escolhidas e amplificadas por PCR.

Exemplos de métodos utilizados para a análise completa do DNA da comunidade são a hibridização do DNA (Buckley *et al.*, 1998) e a cinética de reassociação (Torsvik *et al.*, 1990). Na análise parcial do DNA da comunidade são utilizados métodos que analisam sequências-alvo amplificadas por PCR. As sequências comumente utilizadas são os genes do rDNA 16S, para bactérias (Lane *et al.*, 1985), e a região intergénica do RNA ribossomal, nomeadamente o “internal transcribed spacer” (ITS), no caso dos fungos (Seifert, 2008). Estes métodos incluem a análise por restrição ou sequenciação dos fragmentos de PCR, permitindo aceder à diversidade da comunidade em termos do número de espécies diferentes, assim como à sua abundância relativa. Outra possibilidade é a impressão digital genética, onde é possível aferir, de forma global, acerca da estrutura genética da comunidade microbiana. Estas técnicas baseiam-se na separação das sequências amplificadas, por migração diferencial, em gel de agarose ou acrilamida. A separação pode ser feita consoante o tamanho servindo de exemplo o polimorfismo do tamanho do fragmento de restrição (RFLP) (Liu *et al.*, 1997), análise do espaço intergénico ribossomal (RISA) (Ranjard *et al.*, 2001) e DNA polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD) (Hadrys *et al.*, 1992), ou consoante a sequência – eletroforese em gel com gradiente de desnaturação (DGGE) ou de temperatura (TGGE) (Muyzer *et al.*, 1998).

Diferentes métodos de análise das comunidades fornecem diferentes informações e, portanto, é necessário a aplicação de vários métodos para obter um quadro mais completo das comunidades microbianas (Casamayor *et al.*, 2002; Joynt *et al.*, 2006). A utilização de métodos mais robustos (como a sequenciação) origina uma visão mais detalhada da comunidade mas em contrapartida são mais caros e demorados e exigem maior

conhecimento técnico quando comparados com aqueles que produzem uma imagem “instantânea” da comunidade. Em geral, as técnicas de impressão digital genética, como DGGE e RFLP oferecem um maior rendimento e permitem a comparação de perfis de várias amostras, facilitando dessa forma a análise espacial e temporal das comunidades microbianas nos ecossistemas (Nakatsu, 2007). Num estudo recente, foi utilizada a DGGE e a pirosequenciação para avaliar a variação da composição bacteriana da rizosfera de plantas presentes em mangais. Os autores concluíram que a DGGE é uma técnica robusta, eficaz e de custo reduzido, indicando-a como uma abordagem exploratória para o estudo de comunidades microbianas. Posteriormente podem ser aplicadas outras técnicas que originam maior detalhe, como é o caso da pirosequenciação (Cleary *et al.*, 2012).

1.5 Eletroforese em Gel por Gradiente de Desnaturação (DGGE)

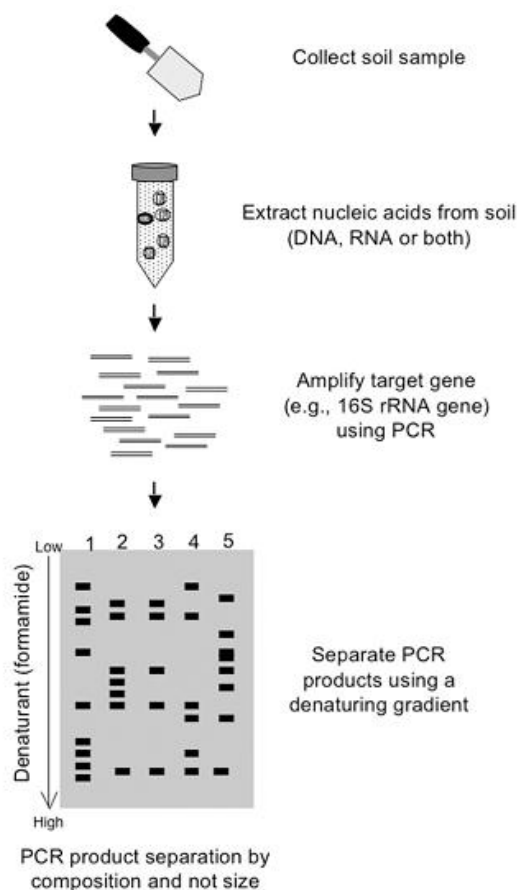


Figura 7. Fluxograma das etapas para a análise da comunidade microbiana utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR) e eletroforese em gel por gradiente de desnaturação (DGGE). (Adaptado) (Nakatsu, 2007).

A aceitação da abordagem de DGGE para análise da comunidade do solo é evidente devido ao aumento constante do número de estudos desde 1997. Em 1993, foi publicado o primeiro artigo científico onde é adaptado o uso de DGGE para análise da comunidade microbiana (Muyzer *et al.*, 1993). Posteriormente, uma série de grupos de investigação aplicaram o método à análise da comunidade do solo (Heuer *et al.*, 1997; Duineveld *et al.*, 1998; Jensen *et al.*, 1998). Os métodos de eletroforese convencionais visam a separação dos fragmentos de DNA consoante o seu tamanho, mas através da DGGE a separação dos fragmentos é feita pela composição da sequência (Hovig *et al.*, 1991).

Este método apresenta o potencial para detetar diferenças no comportamento de fusão de

pequenos fragmentos de DNA que, teoricamente, diferem por tão pouco, como numa única base substituída. O protocolo de PCR-DGGE consiste em seis etapas principais: recolha das amostras, extração do DNA, amplificação do gene-alvo por PCR, separação dos fragmentos amplificados por DGGE, visualização dos perfis e análise de dados (Figura 7). Os fragmentos de DNA (com cerca de 200-700 pb) são obtidos por amplificação do gene-alvo tendo, aproximadamente, o mesmo comprimento. Em seguida, um gel de acrilamida composto por um gradiente linear de desnaturante (de menor para maior concentração) é usado para separar a mistura dos produtos de PCR com diferentes sequências (Muyzer *et al.*, 1993). Na DGGE, a ureia e formamida são usadas como agentes desnaturantes e, num método semelhante, Eletroforese em Gel por Gradiente Térmico (TGGE), é utilizada a temperatura (Muyzer *et al.*, 1998). À medida que os produtos de PCR progridem através do gel, estes são submetidos a condições de desnaturação cada vez mais fortes, chegando a um ponto onde ocorre a separação total da dupla cadeia de DNA. A desnaturação depende principalmente do tamanho do produto, do seu conteúdo em GC e da sequência de nucleótidos. Assim é possível obter uma migração diferencial uma vez que para sequências com maior conteúdo em guanina e citosina é necessária uma maior concentração de desnaturante. Isto deve-se ao facto dos nucleótidos, guanina e citosina, estabelecerem três pontes de hidrogénio entre as cadeias complementares, enquanto a adenina e timina estabelecem apenas duas. O DNA parcialmente desnaturado migra mais lentamente no gel em comparação com a sua conformação nativa, e portanto à medida que as cadeias de DNA se separam, a migração no gel é retardada. Eventualmente a separação das cadeias estende-se por todo o comprimento das cadeias e, de forma a produzir bandas nítidas, um dos “primers” (“forward” ou “reverse”) carrega uma sequência de cerca de 40 pb rica em GC (“clamp” 5’-GC) (Myers *et al.*, 1985), permitindo desta forma uma estabilização da migração do fragmento, evitando assim a separação completa das cadeias (Sheffield *et al.*, 1989). Esta “clamp” tem um ponto de fusão muito elevado e mantém as cadeias de DNA unidas, fazendo com que as moléculas adotem uma forma de borboleta, cuja migração no gel é fortemente retardada em relação às moléculas não fundidas. Assim, os perfis ou impressões digitais genéticas resultantes representam a estrutura da comunidade, uma aproximação do número de populações (representada em cada banda) e a sua abundância relativa (representada pela intensidade da banda) dentro da comunidade amplificada por PCR. Como o PCR é o primeiro passo na DGGE, os perfis de impressão digital são

representativos da proporção de produtos de PCR, não podendo desta forma ser correlacionados diretamente com a proporção dessa população no seio da comunidade (Chandler *et al.*, 1997). Outra desvantagem da técnica deve-se ao facto dos gradientes de desnaturação terem que ser ajustados a cada amostra para uma resolução ideal (Ogier *et al.*, 2002). Sun e seus colaboradores utilizaram a DGGE para documentar as diferenças nas comunidades microbianas no solo que foi ou não tratado com estrume ou fertilizante inorgânico (Sun *et al.*, 2004). Noutro estudo foram comparadas comunidades microbianas do solo sem raízes e da rizosfera de forma a demonstrar o enriquecimento da comunidade devido aos exsudatos da raiz (Duineveld *et al.*, 1998).

1.6 Pirosequenciação

Desde as publicações de Maxam e Gilbert, e Sanger *et al.*, em 1977, onde foram descritos pela primeira vez métodos que permitiam a sequenciação do DNA (Maxam *et al.*, 1977; Sanger *et al.*, 1977), ocorreu uma evolução dramática nos métodos de sequenciação (Figura 8), impulsionada também pelo Projeto do Genoma Humano (Mardis, 2011).

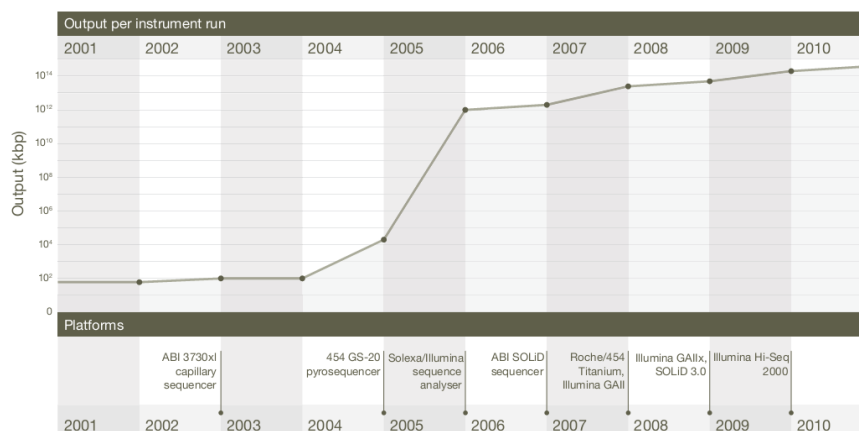


Figura 8. Aumento da capacidade de geração de dados por corrida e plataformas de sequenciação lançadas na última década. (Adaptado) (Mardis, 2011).

Estes novos métodos de sequenciação paralela massiva, nomeadamente a sequenciação 454 da Roche (<http://www.454.com/>), fornecem uma plataforma conveniente para uma gama ampla de aplicações que envolvem a sequenciação de genomas, de transcriptomas, de amplicões ou de metagenomas. A plataforma de sequenciação 454 da Roche tem vindo a ser usada para a caracterização de comunidades microbianas. Uroz e colaboradores observaram uma grande diversidade de comunidades bacterianas que

colonizavam a rizosfera de carvalho e assim como do solo circundante. Ao compararem esses dois micro-habitats verificaram que as proporções relativas dos diferentes filos apresentavam diferenças significativas. A rizosfera era dominada por β -, γ - e proteobactérias em geral e, por outro lado, bactérias não classificadas estavam presentes em maior abundância no solo circundante, demonstrando que o solo continua a ser um reservatório de diversidade microbiana desafiante (Uroz *et al.*, 2010). Num estudo publicado em 2011, investigadores verificaram, através da pirosequenciação, que a diversidade bacteriana era, filogeneticamente, mais rica em pastagens do que em solos florestais, demonstrando desta forma que diferentes tipos de gestão dos solos influenciam a diversidade bacteriana assim como a estrutura dessa comunidade (Nacke *et al.*, 2011).

Neste tipo de abordagem é necessário construir uma biblioteca de sequências que permitam a identificação filogenética, onde, como referido anteriormente, são utilizados os genes do rRNA 16S e o ITS, para bactérias e fungos, respetivamente. Esta mistura complexa de sequências é denominada biblioteca de amplicões (Roche, 2006). O procedimento de preparação das amostras de DNA para a sequenciação de amplicões consiste numa simples reação de amplificação por PCR, onde são usados “primers” de fusão especiais (Figura 9) (Roche, 2006). A extremidade 3' (com cerca de 20-25 pb) de cada “primer” de fusão é desenhada para se ligar com uma sequência específica de forma a flanquear o gene de interesse, delineando as margens dos amplicões que serão produzidos (não devendo estes exceder mais de 500 pb) (Roche, 2006).

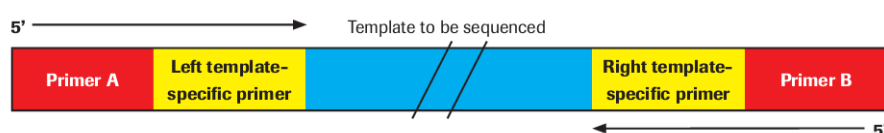


Figura 9. Representação esquemática dos produtos da biblioteca de amplicões (Roche, 2006).

Isso requer o conhecimento detalhado da sequência-alvo, em particular dos locais reconhecidos pelos “primers”, que para os genes em estudo correspondem a regiões conservadas entre as bactérias e os fungos. Para a extremidade 5', os “primers” correspondem a adaptadores do tipo A ou B, permitindo *a posteriori* a combinação com outros componentes do sistema de sequenciação. Estes “primers” contêm ainda uma sequência chave para controlo interno da sequenciação (Roche, 2009). De forma a permitir a identificação das diferentes amostras após a sequenciação, os “primers” incorporam uma sequência identificadora entre o adaptador A ou B (extremidade 5') e a sequência

específica (extremidade 3'), que por analogia serve como um "código de barras" das amostras (Roche, 2009). Após a construção da biblioteca de amplicões, os fragmentos são imobilizados em "beads" de captura de DNA, de forma a permitir a sua segregação na emulsão (Figura 10). O objetivo deste passo é conseguir captar uma molécula de DNA por "bead", e a cada micro-reator (micela) fazer corresponder uma "bead" isolada das outras pelo óleo circundante (Roche, 2008).

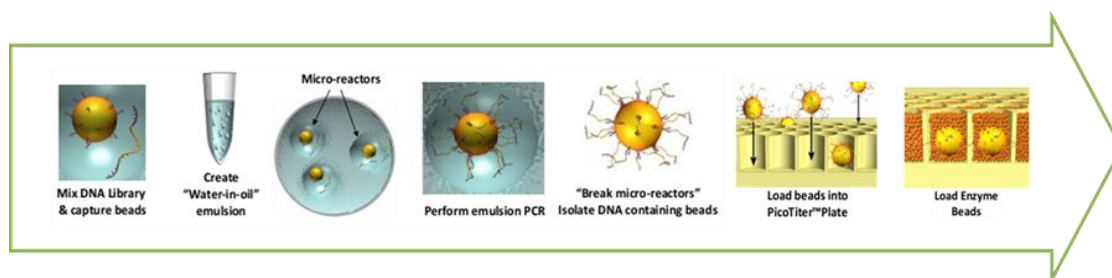


Figura 10. Esquema representativo dos passos para construção da biblioteca de "beads" com DNA amplificado que serão carregadas na placa de sequenciação. (Adaptado) (Ansorge, 2009).

A separação de cada "bead" no seu próprio micro-reator (com os reagentes necessários para a amplificação por PCR) irá permitir que em cada "bead" apenas exista um tipo de "clone" durante a etapa de amplificação. O processo de captura envolve a hibridização do adaptador B, que foi ligado ao terminal 3' de cada molécula molde durante a preparação da biblioteca, aos oligonucleotídeos complementares que estão covalentemente ligados às "beads" de captura de DNA (Roche, 2008). Para a formação dos micro-reatores é feita uma emulsão (Figura 10), onde a biblioteca de DNA-"bead" é ressuspensa numa mistura de amplificação e óleo, de modo a formar uma emulsão em óleo. Este passo envolve uma agitação mecânica vigorosa sob condições controladas. Os produtos do passo da emulsificação são micro-reatores (fase aquosa) com cerca de 50-100 μm de diâmetro, contendo cada um deles todos os componentes necessários à amplificação por PCR e uma única "bead". As "beads" em emulsão são então sujeitas a PCR clonal para amplificação de cada molécula de DNA molde, denominando-se este processo de PCR de emulsão (emPCR) (Roche, 2008). Após vários ciclos o número de cópias imobilizadas ronda as $10\text{-}50 \times 10^6$ por "bead" (Figura 10). Posteriormente a emulsão é quebrada quimicamente, e as "beads" que contêm a biblioteca de DNA amplificado (na forma de dupla cadeia) são recuperadas e lavadas. As "beads" que contêm DNA amplificado são enriquecidas da população total de "beads" através da hibridização do "primer" enriquecido com biotina, ligando-se a esferas magnéticas revestidas com estreptavidina. As "beads" com DNA são

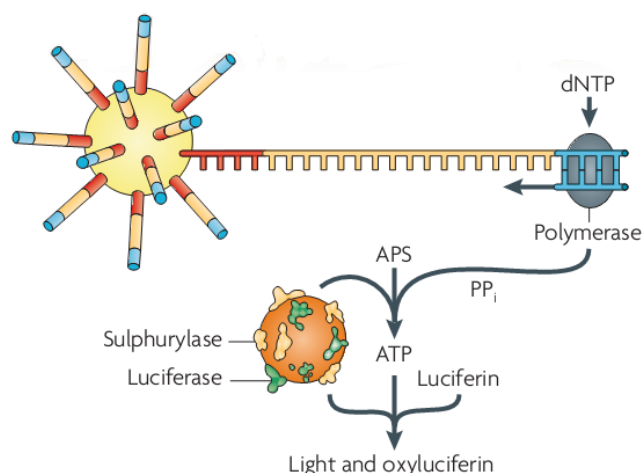


Figura 11. Cascata de reações enzimáticas que originam a produção de luz, processo necessário para este tipo de sequenciação. (Adaptado) (Metzker, 2010).

Figura 11 é apresentado um esquema acerca da química inerente ao processo de sequenciação. Inicialmente, o “primer” é hibridizado com o amplicão de PCR de cadeia simples que serve como molde à polimerização. Juntamente, são incubadas determinadas enzimas, DNA polimerase, ATP sulfurilase, luciferase e apirase, assim como os seus respectivos substratos, adenosina fosfossulfato e luciferina. O primeiro trifosfato desoxirribonucleótido (dNTP) é adicionado à reação. A DNA polimerase catalisa a incorporação desse dNTP na cadeia de DNA, caso este seja complementar à base presente

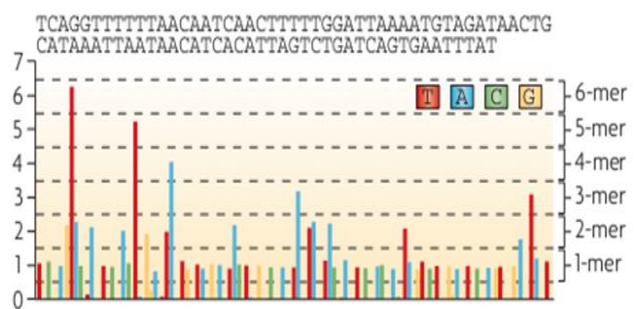


Figura 12. A luz gerada pela cascata de reações enzimáticas é gravada como uma serie de picos denominada pirograma. (Adaptado) (Metzker, 2010)

na cadeia molde. Em cada incorporação é libertado um pirofosfato (PPi) numa quantidade equimolar à quantidade de nucleótidos incorporados. A ATP sulfurilase converte PPi em ATP na presença de adenosina fosfossulfato (APS). Este ATP leva à conversão de luciferina a oxiluciferina, mediada pela luciferase, gerando luz visível em

separadas das esferas magnéticas através da desnaturação dos produtos da amplificação, formando-se uma população de “beads” que carregam fragmentos de DNA de cadeia simples, constituindo este o material de entrada no sequenciador (Roche, 2008). As “beads” são colocadas numa placa com cerca de 1 milhão de poços e em cada um apenas cabe uma “bead” com múltiplas cópias da sequência a determinar (Figura 10). Na

quantidades proporcionais à quantidade de ATP formado (Ahmadian *et al.*, 2006). A luz produzida na reação catalisada pela luciferase é detetada por um dispositivo de carga acoplado, que é vista como um pico na saída de dados em bruto, dando origem a um gráfico denominado pirograma (Figura 12) (Ronaghi, 2011). A altura de cada pico (sinal

luminoso) é proporcional ao número de nucleótidos incorporados. A apirase degrada os nucleótidos que não foram incorporados, assim como o ATP em excesso (Ahmadian *et al.*, 2006). Quando a degradação está completa, outro nucleótido é adicionado. Como o processo continua e a adição dos dNTPs é feita sequencialmente, a cadeia de DNA complementar é construída e a sequência de nucleótidos é determinada a partir dos picos de sinal registados no pirograma. Para cada poço é gerado um pirograma correspondente a uma única molécula de DNA presente na amostra de DNA amplificado.

1.7 Bioinformática

A sequenciação de DNA presente em amostras ambientais veio permitir alargar e explorar a diversidade de microrganismos até agora desconhecidos. Em particular, a introdução da tecnologia de pirosequenciação veio revolucionar a habilidade de explorar esta diversidade oculta (Margulies *et al.*, 2005). A sequenciação de última geração de regiões do genoma como ITS, 16S e 18S do rDNA permite analisar a variação genética destas regiões, possibilitando a identificação dos microrganismos eucariotas e procariotas presentes em amostras ambientais (Margulies *et al.*, 2005; Edwards *et al.*, 2006; Sogin *et al.*, 2006; Roesch *et al.*, 2007; López-García *et al.*, 2008). A análise de enormes quantidades de dados produzidos pelos novos métodos de sequenciação exige aplicações eficientes e flexíveis de bioinformática que tanto se ajustem às necessidades dos utilizadores assim como às características dos dados de sequenciação. Várias ferramentas de bioinformática estão disponíveis para o processamento e agrupamento de sequências geradas pela plataforma 454, servindo de exemplos MOTHUR (Schloss *et al.*, 2005), MG-RAST (Meyer *et al.*, 2008), RDP (Cole *et al.*, 2009), QIIME (Caporaso *et al.*, 2010), CloVR (White *et al.*, 2011), CLOTU (Kumar *et al.*, 2011) e MEGAN4 (Huson *et al.*, 2011).

No processamento dos dados gerados no sequenciador da 454 Life Sciences é combinado software variado que permite uma rápida análise de sequências de rDNA. Na Figura 13 é apresentado um esquema geral dos principais passos necessários para o processamento de dados, podendo estes apresentar variações entre as diferentes ferramentas de processamento de dados de sequenciação disponíveis. De uma forma geral, as “pipelines” de classificação automática iniciam-se com a separação das sequências pelas diferentes amostras, através da sequência identificadora que incorporam, e diversos

parâmetros de qualidade são aplicados de forma a eliminar sequências de baixa qualidade. Posteriormente, as sequências são agrupadas em Unidades Taxonómicas Operacionais (OTUs, do inglês Operational Taxonomic Units) e é realizada a atribuição taxonómica das mesmas usando sequências de referência depositadas em base de dados. Finalmente é estimada a riqueza e diversidade microbiana através de diferentes métodos estatísticos e são gerados dados que permitem a análise simples e rápida assim como ficheiros que permitem a utilização de outros softwares de análise de metagenoma, como por exemplo o Metastats (White *et al.*, 2009). O Metastats é um método estatístico que permite detetar diferenças entre duas populações e avaliar a significância das diferenças observadas.

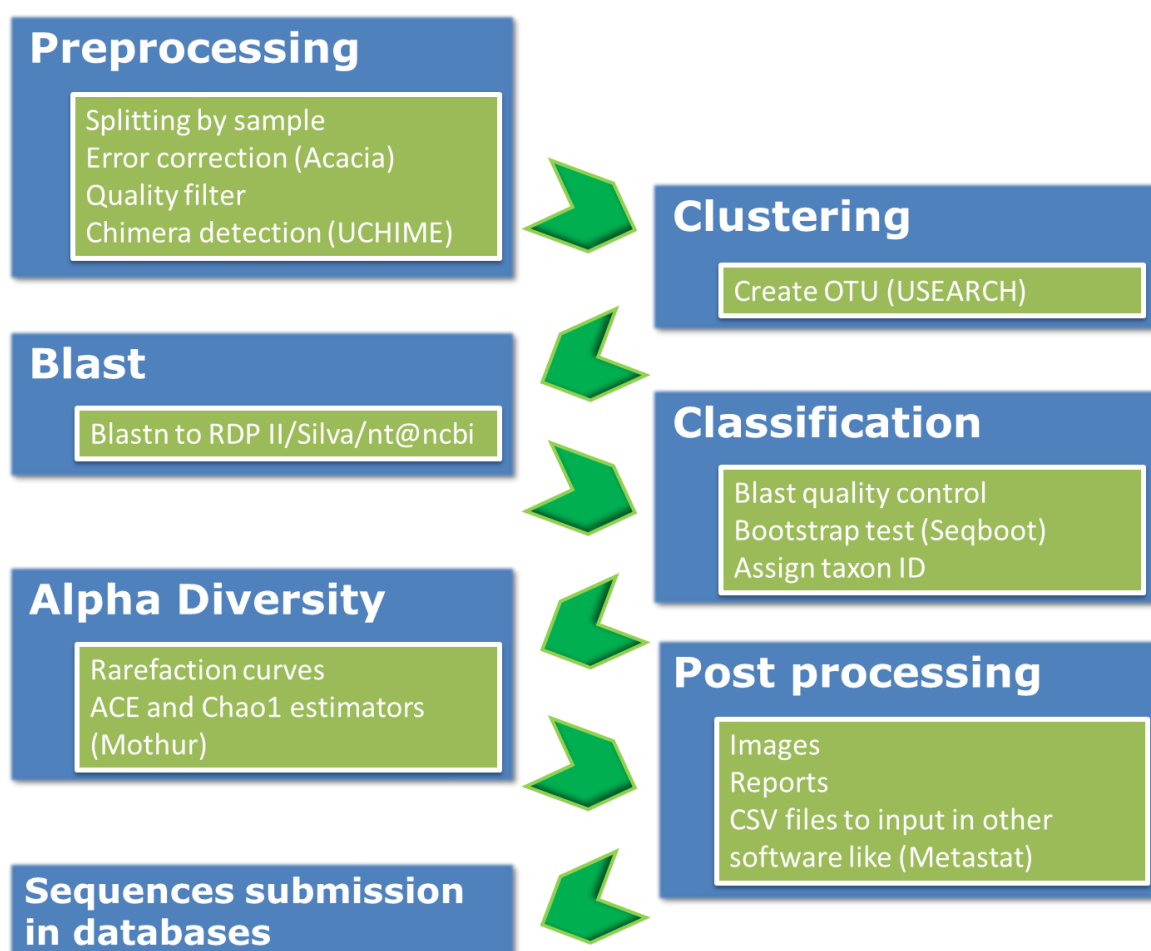


Figura 13. Esquema geral da “pipeline” de classificação automática implementada na Unidade de Bioinformática do Biocant (Cantanhede, Portugal) para o processamento de dados gerados na sequenciação em projetos de análise de rDNA.

1.8 Objetivos do Trabalho

O estudo a efetuar visa caraterizar o microbioma do solo associado a cada estado fitossanitário de *Quercus suber*. Para isso foram escolhidas as técnicas de eletroforese em gel com gradiente de desnaturação e pirosequenciação de forma a caraterizar e comparar o microbioma do solo de sobreiros saudáveis e doentes. A combinação destas duas técnicas permite aferir de forma rápida e detalhada, respetivamente, a existência de um ou mais grupos de bactérias e/ou fungos preferencialmente associados ao estado de fitossanidade do sobreiro. Os resultados obtidos permitirão estabelecer bases para melhor compreender a relação entre o microbioma do solo e o sobreiro.

2 MÉTODOS

2.1 Recolha das Amostras de Solo

As amostras de solo foram recolhidas na Herdade dos Trabalhos, Coruche, Portugal (Figura 14). Em cada árvore foram recolhidas 4 amostras, perpendiculares entre si (Figura 15A), que foram misturadas no mesmo saco estéril, formando uma amostra composta. Este tipo de recolha permite minimizar a variabilidade entre árvores do mesmo grupo (saudável e doente). Neste trabalho foram recolhidas oito amostras compostas de solo de árvores saudáveis (1S, 3S, 5S, 7S, 9S, 11S, 15S e 17S) e oito de árvores doentes (2D, 4D, 6D, 8D, 10D, 12D, 14D e 16D), recolhendo-se um total de dezasseis amostras compostas. As amostras foram recolhidas a meio do raio da copa das árvores, a uma profundidade de cerca de 30 cm, após remoção da camada orgânica superficial (Figura 15B). Todas as amostras foram recolhidas com equipamento estéril, transportadas a 4 °C em sacos estéreis isolados e processadas em menos de 24 horas.

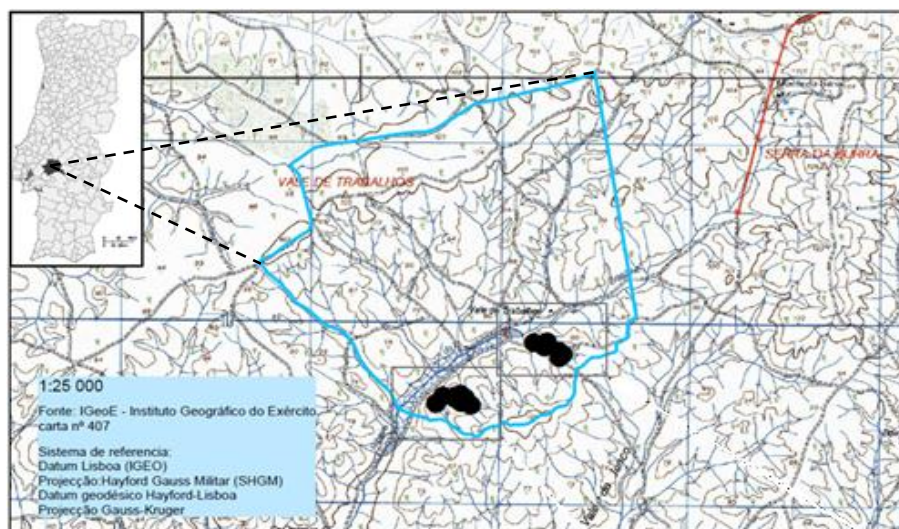


Figura 14. Local de recolha das amostras de solo. As amostras foram recolhidas na Herdade dos Trabalhos, Coruche, Portugal. Os pontos a preto indicam a zona da Herdade onde se procedeu à recolha das amostras.

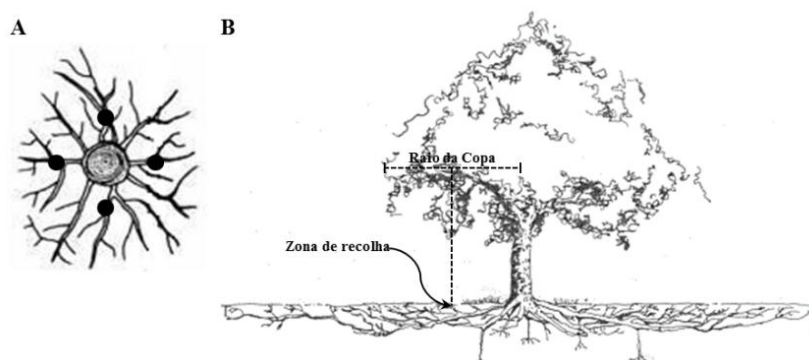


Figura 15. Esquema da zona de amostragem. (A) Quatro amostras em perpendicular (pontos a preto) foram recolhidas em cada árvore; (B) A recolha foi realizada a meio do raio das copas das árvores.

2.2 Análise Físico-Química do Solo

Inicialmente, as amostras foram homogeneizadas manualmente, de forma a reduzir a heterogeneidade intrínseca. Foram realizadas duas misturas em duplicado de cada tipo de solo, onde foram misturadas cerca de 100 g de cada amostra de solo proveniente de árvores saudáveis ou de árvores doentes, perfazendo um total de 800 g por amostra. Estas 4 amostras compostas (saudável 1, saudável 2, doente 1 e doente 2) foram enviadas para o CESAB - Centro de Serviços do Ambiente (Mealhada, Portugal) tendo sido requeridas as seguintes análises: pH, humidade, matéria orgânica, carbono orgânico, azoto total, fósforo total e boro.

2.3 Extração das Células Microbianas do Solo

Após homogeneização, cerca de 10 g de cada amostra composta foi transferida em triplicado para tubos de 50 mL. O volume foi ajustado com água peptonada até perfazer cerca de 45 mL, seguindo-se agitação vigorosa no vórtex para completa homogeneização e libertação das células presentes nos agregados do solo. Vinte mililitros de cada triplicado foram filtrados com gaze para novos tubos de 50 mL para remoção de detritos e foram adicionados mais 20 mL de água peptonada. Após centrifugação (4000 rpm, 10 min, 4 °C) os sobrenadantes foram descartados e os “pellets” foram lavados com 20 mL de tampão Tris-EDTA 1× (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0), seguida de nova centrifugação nas mesmas condições. Os sobrenadantes foram novamente descartados e a cada triplicado foram adicionados 6 mL de meio de cultura “Potato Dextrose Broth” com 40 % de glicerol, de forma a evitar a lise celular, e procedeu-se ao armazenamento dos “pellets” -80 °C até extração do DNA.

2.4 Extração do DNA da Comunidade Microbiana

Na extração do DNA total da comunidade microbiana foi utilizado o kit QIAamp[®] DNA Stool Mini (QIAGEN, Hilden, Germany) com algumas modificações das instruções do fabricante. Este kit permite o isolamento e purificação do DNA total de forma rápida e simples compreendendo os seguintes passos: lise das amostras em tampão ASL; adsorção de impurezas na matriz InhibitEX e purificação do DNA em colunas QIAamp Mini spin.

Após descongelamento das amostras, 500 µL de “pellet” foram centrifugados (14800 rpm, 5 min, temperatura ambiente) e os sobrenadantes foram descartados. Adicionaram-se 500 µL de tampão ASL (pré-aquecido a 70 °C) e cerca de 200 µL de esferas de vidro hidratadas (Ø 0,5-0,75 mm; Retsch, Haan, Germany) de forma a maximizar a lise celular. No Tissue-lyser (QIAGEN, Hilden, Germany) foram realizados 2 ciclos de 30 Hz, durante 5 min, com dois minutos em gelo entre os ciclos. Após centrifugação, a 14800 rpm durante 3 min, os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos de 2 mL. Para remover algum material retido nas esferas, foram adicionados mais 500 µL de tampão ASL a cada amostra, seguindo-se agitação forte no vórtex e nova centrifugação nas condições acima referidas. Os sobrenadantes obtidos foram transferidos para os tubos correspondentes, aos quais se adicionou uma pastilha InhibitEx, para remoção dos inibidores de PCR. Previamente foram transferidos 30 µL de QIAGEN Proteinase K (20 mg/mL) e 400 µL de tampão AL para um tubo de 1,5 mL, aos quais se adicionou cerca de 400 µL do sobrenadante e após homogeneização no vortex a mistura foi a incubar a 70 °C durante 10 min. Este passo permite a rápida inativação de DNases e RNases de forma a evitar a degradação do DNA. Após adição de 400 µL de etanol (96-100%), para precipitação do DNA, 2x600 µL do lisado foram transferidos para uma coluna QIAamp Mini spin. Todos os passos seguintes de recuperação e purificação do DNA foram realizados segundo as instruções do fabricante. Como passo final, as amostras foram concentradas no Savant SpeedVac® DNA 120 Concentrator (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), reduzindo-se o volume até cerca de 40 µL e armazenadas a -20 °C até futura utilização.

Posteriormente procedeu-se à amplificação da região V6 do gene 16S do rRNA (bactérias) e da região ITS II dos genes rRNA (fungos) de algumas amostras, permitindo desta forma verificar a presença de inibidores do PCR. Estas regiões foram amplificadas utilizando os “primers” apresentados na Tabela 1 (Baker *et al.*, 2003; Sogin *et al.*, 2006).

Tabela 1. Sequência dos “primers” usados na amplificação por PCR.

Região-alvo	Direção	Sequência do “Primer”
V6	“Forward”	5'-ATG CAA CGC GAA GAA CCT-3'
V6	“Reverse”	5'-TAG CGA TTC CGA CTT CA-3'
ITS II	“Forward”	5'-GCA TCG ATG AAG AAC GC-3'
ITS II	“Reverse”	5'-CCT CCG CTT ATT GAT ATG C-3'

As misturas de reação continham 5% de DMSO (v/v) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), 1× de tampão Advantage[®] 2 PCR (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA), 0,2 mM de mistura de dNTPs (Bioron, Ludwigshafen am Rhein, Germany), 0,2 µM de cada “primer” (Sigma-Aldrich, Missouri, US), 1× de Advantage 2 Polymerase Mix (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA) e 2 µL do DNA molde, num volume total de 25 µL. A amplificação por PCR foi realizada no termociclador MyCycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). As condições de amplificação da região V6 foram as seguintes: uma desnaturação inicial (94 °C, 4 min), 25 ciclos de desnaturação (94 °C, 30 s), emparelhamento (50 °C, 45 s) e alongamento (68 °C, 60 s), e uma extensão final (68 °C, 10 min); e para a região ITS II foram: desnaturação inicial (94 °C, 4 min), 30 ciclos de desnaturação (94 °C, 30 s), emparelhamento (50 °C, 40 s), e alongamento (68 °C, 40 s) e uma extensão final (68 °C for 10 min). Um microlitro de DNA genómico de *Rubrobacter sp.* (25 ng/µL) e de *Saccharomyces cerevisiae* (100 ng/µL) de foram usados como controlo positivo nas amplificações das regiões V6 e ITS II, respetivamente. Nos dois ensaios de amplificação foram incluídos controlos negativos. Três microlitros dos produtos do PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1% e corados com brometo de etídio, esperando-se obter um amplicão com um tamanho de cerca de 450 pb.

2.5 Eletroforese em Gel com Gradiente de Desnaturação

Inicialmente foi realizada uma otimização do PCR usando os “primers” desenhados para análise por DGGE (Tabela 2). As regiões V6 e ITS II foram amplificadas usando “primers” universais para Bacteria e Eukarya previamente descritos (Baker *et al.*, 2003; Sogin *et al.*, 2006). Aos “primers” forward foram adicionadas caudas de GCs (Tabela 2) de forma a evitar a completa desnaturação dos fragmentos aquando da separação em condições desnaturantes (Muyzer *et al.*, 1993).

Tabela 2. Sequência dos “primers” usados na amplificação por PCR para análise por DGGE. Os “primers forward” contêm uma cauda de GCs e a zona de reconhecimento da região a amplificar está indicada a sublinhado.

Região-alvo	Direção	Sequência do “Primer”
V6	Forward	5'-CGC CCG CCG CGC GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAT GCA ACG CGA AGA ACC T-3'
V6	Reverse	5'-TAG CGA TTC CGA CTT CA-3'
ITS II	Forward	5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GGC ATC GAT GAA GAA CGC-3'
ITS II	Reverse	5'-CCT CCG CTT ATT GAT ATG C-3'

Quando aplicadas as mesmas condições de PCR acima descritas (secção “Extração do DNA da Comunidade Microbiana”) e os “primers” indicados na tabela 2 não se obtiveram bandas em gel ou estas eram demasiado fracas. Para contornar este problema a quantidade de DNA molde e o número de ciclos foram aumentados, tendo-se também modificado ligeiramente o programa de PCR. Após a otimização, chegaram-se às seguintes condições de PCR: 25 µL das misturas de reação continham 5% de DMSO (v/v) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), 1× de tampão Advantage® 2 PCR (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA), 0,2mM de mistura de dNTP's (Bioron, Ludwigshafen am Rhein, Germany), 0,2 µM de cada “primer” (Sigma-Aldrich, Missouri, US), 1× Advantage 2 Polymerase Mix (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA) e 4µL de DNA molde. A região V6 foi amplificada usando o seguinte programa: desnaturação inicial (94 °C, 4 min); 30 ciclos de desnaturação (94 °C, 30 s), emparelhamento (50 °C, 45 s), e alongamento (68 °C, 60 s); extensão final (68 °C, 10 min). As condições para a região ITS II foram as mesmas mas foram realizados 35 ciclos de desnaturação, emparelhamento e alongamento. Em ambas as amplificações foram usados controlos positivos e negativos anteriormente referidos (ver secção “Extração do DNA da Comunidade”), tendo-se utilizado o termociclador MyCycler (Bio Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) para o efeito. Três µL dos produtos de PCR foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 1%, usando-se brometo de etídio como corante, esperando-se obter um amplicão com cerca de 420 pb. As bandas obtidas na amostra 6.1D eram demasiado fracas e portanto a amplificação desta amostra foi repetida usando diluições de DNA de 1:1, 1:10 e 1:100. O melhor resultado obtido foi para a diluição de 1:10 e portanto todas as experiências posteriores foram realizadas utilizando-se a amostra 6.1D diluída.

Para que os perfis genéticos obtidos fossem comparáveis foi necessário colocar a mesma quantidade de DNA, pelo que os produtos de PCR foram quantificados em cada triplicado por fluorimetria usando o kit Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante.

As amostras contendo aproximadamente quantidades iguais de amplicões de PCR (915-1050 ng) foram carregadas em géis de 8 % de poliacrilamida (37,5:1, acrilamida/bisacrilamida) em tampão Tris-Acetato-EDTA 0,5x (20 mM Tris–acetato pH 7,4, 10 mM acetato de sódio, 0,5 mM Na₂EDTA) usando um gradiente de desnaturação linear de 30 a 60 % (o desnaturante a 100% continha 7 M ureia e 40% formamida). Em todos os géis foram colocados marcadores de DGGE em duplicado para normalização

interna e para indicação da qualidade da análise (Henriques *et al.*, 2006). A DGGE foi realizada usando o DCode™ Universal Mutation Detection System (Bio Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) a 60 °C, inicialmente a 20 V durante 15 min e depois a 75 V por 16 horas. Após a eletroforese os géis foram corados com brometo de etídio (5 min) e lavados em água destilada (20 min).

2.5.1 Análise dos Dados

As imagens dos géis foram adquiridas usando o Molecular Imager FX system (Bio-Rad Laboratories) e por fim estas foram analisadas usando o software GelCompar 4.0 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium). Antes de efetuar a análise no software mencionado, as imagens adquiridas foram recortadas de forma a apenas analisar a região delimitada pelos marcadores de DGGE. A partir dos perfis de DGGE obtidos construíram-se dendrogramas utilizando o coeficiente de correlação de Pearson para construção das matrizes de similaridade e o método UPGMA (do inglês, Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) para agrupamento hierárquico dos perfis de DGGE. As curvas densitométricas foram exportadas e, através do software desenvolvido pelo Prof. António Barros da Universidade de Aveiro, foi realizada a Análise por Componentes Principais (PCA), para comparação das populações de bactérias e de fungos entre árvores saudáveis e doentes. Usando o programa MVSP – MultiVariate Statistical Pachage (Kovach Computing Services, Wales, U.K.) foram calculados os índices de Shannon, equitatividade e foi estimado o número de espécies, de forma a verificar de diversidade estrutural das comunidades microbianas.

2.6 Pirosequenciação

A partir dos resultados da DGGE foram selecionadas as seguintes amostras representativas de cada grupo: 1S, 3S, 5S, 9S, 15S, 17S, 4D, 6D, 8D, 12D, 14D e 16D. De salientar que cada amostra é constituída por três réplicas. O DNA de cada uma foi usado como molde para a amplificação das regiões V6 e ITS II. Os “primers” utilizados, para além de conterem a sequência de reconhecimento da zona a amplificar (Tabela 1), continham outras sequências necessárias às etapas de sequenciação na plataforma 454 da Life Sciences (Roche, Branford, Connecticut, USA). Estas sequências são os adaptadores, sequência chave para controlo interno da sequenciação e uma sequência identificadora de 8 nucleótidos (ver anexos) que permite a mistura de várias amostras

para pirosequenciação. Após otimização das condições da amplificação, cada tubo de PCR (25 µL) continha 5% de DMSO (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), tampão 1X Advantage 2 SA PCR (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA), 0,2 mM de mistura de dNTPs (Bioron, Ludwigshafen am Rhein, Germany), 0,2 µM de cada “primer” (Sigma-Aldrich, Missouri, USA), 1× Advantage 2 Polymerase Mix (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA) e 2 µl de DNA molde. Todas as amplificações foram realizadas no termociclador MyCycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) tendo sido usado o seguinte programa: desnaturação inicial (94 °C, 4 min); 25 e 30 ciclos de desnaturação (94 °C, 30 s), emparelhamento (50 °C, 45s) e alongamento (68 °C, 60 s) para as regiões V6 e ITS II, respetivamente; e uma extensão final (68 °C, 10min). O tamanho estimado dos amplicões era de cerca de 450 pb. Como nos triplicados das amostras 4D e 14D (região V6), e 5S e 16D (região ITS II) não se verificou uma boa eficiência de amplificação optou-se por fazer uma mistura dos mesmos a partir deste ponto.

Assim, as 52 bibliotecas de amplicões obtidas foram purificadas com esferas AMPure XP (Agencourt, Beckman Coulter, USA) de acordo com as instruções do fabricante e a qualidade de algumas bibliotecas avaliada em gel de agarose a 1% (w/v), de forma a verificar a ausência dos “primers” utilizados no PCR após a purificação. Posteriormente o DNA foi quantificado usando o kit Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante e procedeu-se à mistura equimolar dos triplicados, obtendo-se no final 24 bibliotecas de amplicões. De seguida procedeu-se a uma mistura final das amostras do grupo da região V6 e do ITS II. Para isso foi determinado o número de moléculas por microlitro presente em cada amostra (através das concentrações estimadas na mistura dos triplicados), para que cada amostra estivesse representada com igual número de moléculas na mistura final. Na determinação da percentagem de eficiência de amplificação foi realizada a titulação destas duas misturas através do kit KAPA Library Quantification for Roche 454 GS FLX platform (Kapa Biosystems, Boston, USA), segundo as instruções do fabricante. O PCR clonal de emulsão foi realizado seguindo as instruções do fabricante (454 Life Sciences, Roche, Branford, Connecticut, USA), tendo como principais etapas a preparação das misturas para amplificação, captura da biblioteca de DNA, emulsificação, amplificação, recuperação das esferas, enriquecimento da biblioteca de esferas-DNA e emparelhamento do “primer” de sequenciação. Finalmente procedeu-se à sequenciação das amostras a partir do adaptador A no pirosequenciador Genome

Sequencer FLX (454 Life Sciences, Roche, Branford, Connecticut, USA) do Biocant (Cantanhede, Portugal), usando um quarto da placa de sequenciação GS Titanium PicoTiterPlate 70x75.

2.6.1 Processamento dos Dados

Os dados gerados pelo sequenciador foram analisados por uma “pipeline” de classificação automática implementado na Unidade de Bioinformática do Biocant (Cantanhede, Portugal). A “pipeline” foi escrita em python e combina variado software, permitindo uma rápida análise de sequências de rDNA.

Numa primeira fase, as sequências foram separadas pelas diferentes amostras segundo a sequência identificadora, presente na parte inicial. Posteriormente, foram exigidos diferentes parâmetros de qualidade de forma a remover sequências de baixa qualidade, nomeadamente:

- Eliminar sequências com menos de 150 pb;
- Eliminar sequências que contêm mais de 2 nucleótidos indefinidos;
- Cortar pelo “primer reverse” caso a sequência o tenha atingido;
- Cortar a sequência na posição onde a média de qualidade baixar os 15 numa janela de 7 bases;
- Eliminar sequências com mais de 50% de regiões de baixa complexidade, através da aplicação DustMasker (Morgulis *et al.*, 2006);
- Remover quimeras identificadas através do UChime (Edgar *et al.*, 2011).

Posteriormente, as sequências foram agrupadas a uma distância filogenética de 3%, que corresponde o limite do nível de espécie, originando Unidades Taxonómicas Operacionais (OTU, do inglês Operational Taxonomic Units). Esta operação foi realizada no USearch (Edgar, 2010) que cria, de forma automática, sequências consenso através da sobreposição das sequências. A riqueza da população (curvas de rarefação) e o índice de diversidade (Chao1) foram calculados usando o software Mothur (Schloss *et al.*, 2009).

Na etapa seguinte, as OTUs foram comparadas com as sequências depositadas em bases de dados curadas, usando a ferramenta BLASTn, para identificação taxonómica das mesmas. Na identificação das OTUs da região V6 foi utilizada a base de dados Ribosomal Database Project II (Cole *et al.*, 2009) e para a região ITS II foi

usada a base de dados SILVA (Pruesse *et al.*, 2007). Após a obtenção dos resultados, os “hits” foram sujeitos a um novo controlo de qualidade, sendo rejeitados todos aqueles com uma similaridade inferior a 40% e que obtiveram um “Evalue” superior a $1e^{-50}$. Em simultâneo, foram também aplicados testes de “bootstrap” para conferir graus de confiança quanto à identificação taxonómica das OTUs. Este teste foi aplicado com o recurso do software seqBoot do pacote Phylip (Felsenstein, 1989) em que são criadas 100 réplicas com 5% de variações em relação às OTUs em análise.

O processo de identificação é bastante complexo uma vez que é necessário corrigir a pontuação “Evalue”, percorrer todos os níveis taxonómicos e identificar o mínimo comum na árvore taxonómica, envolvendo simultaneamente o teste “bootstrap”, isto é identificar o nível taxonómico com um valor de “bootstrap” superior a 70%. No final, variados ficheiros e relatórios são criados facilitando a análise e a introdução dos resultados em outras aplicações de análise, incluído um com todos os organismos identificados, por amostra, contendo também a abundância das sequências atribuídas às OTUs.

2.6.2 Análise dos Dados

De forma a verificar a distribuição taxonómica foi utilizada a ferramenta online iTOL (Letunic *et al.*, 2011) para construção das árvores filogenéticas a partir das OTUs identificadas para o grupo das bactérias e fungos. A comparação dos microbiomas de solo de árvores saudáveis e doentes foi realizada utilizando o Metastats (White *et al.*, 2009), tendo sido também realizadas PCAs, através do software desenvolvido pelo Prof. António Barros da Universidade de Aveiro, e foram construídos dendrogramas usando o coeficiente de Pearson e o método UPGMA através do software GelCompar 4.0 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Parâmetros Físico-Químicos do Solo

Na Tabela 3 são apresentados os resultados dos parâmetros físico-químicos do solo analisados, não se observando diferenças significativas entre o solo de árvores saudáveis e de árvores doentes.

Tabela 3. Resultados dos parâmetros físico-químicos do solo de árvores saudáveis e decrépitas (média \pm desvio-padrão).

Parâmetro	Saudável	Doente	Unidade	Método de Análise
pH (19°C)	5,4 \pm 0,1	5,5 \pm 0,0	Escala de Sorensen	EPA 9045 D: 2004
Humidade	7,0 \pm 0,5	7,1 \pm 0,1	%	PT-MET-53 (2006-03-29) (Baseado EN 12880 e EN 12879:2000)
Matéria Orgânica	1,7 \pm 0,0	1,3 \pm 0,1	%	PT-MET-53 (2006-03-29) (Baseado EN 12880 e EN 12879:2000)
Carbono Orgânico	0,96 \pm 0,0	0,76 \pm 0,06	%	Cálculo
Azoto Total	0,5 \pm 0,1	0,4 \pm 0,0	g N/Kg mat. seca	PT-MET-56 (2010-04-22)
Fósforo Total	< 0,1	< 0,1	g O/Kg mat. seca	SMEWW 4500-P C
Boro	< 10	< 10	g B/Kg mat. seca	PT-MET-26 (2008-07-25) (Baseado SMEWW 3120B)

3.2 Extração do DNA

Após a extração do DNA da comunidade microbiana algumas das amostras foram amplificadas de forma a verificar a presença de inibidores de PCR. Através do gel apresentado na Figura 16 verifica-se que para as amostras testadas ocorreu uma boa eficiência de amplificação da região V6, assim como para a região ITS II (o gel não é apresentado), obtendo-se um amplicão com cerca de 450 pb, como esperado. Desta forma podemos concluir que a extração simultânea do DNA de bactérias e fungos presente nas amostras de solo foi bem sucedida.

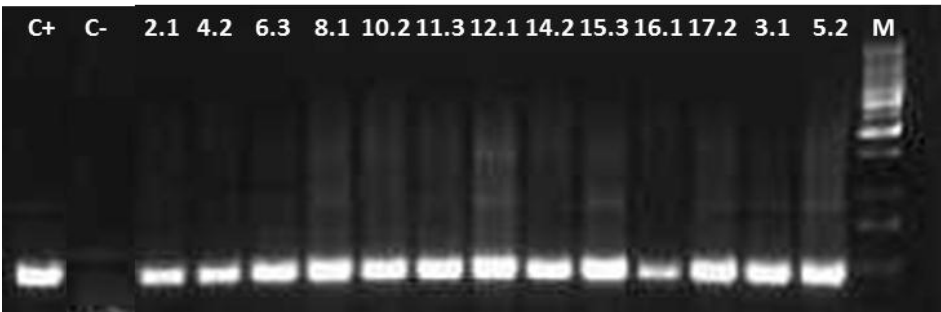


Figura 16. Gel de agarose (1%) obtido após a amplificação por PCR da região V6. C+: controlo positivo (DNA genómico de *Rubrobacter sp.*); C-: controlo negativo; os números correspondem a um dos triplicados de cada amostra; M: marcador de peso molecular 1 Mbp.

3.3 DGGE

Inicialmente procedeu-se à otimização do PCR, uma vez que usando os “primers forward” com cauda de CG não foram obtidos quaisquer produtos de PCR utilizando as condições inicialmente descritas (ver capítulo dos métodos). Após o aumento dos ciclos de amplificação, da quantidade inicial de DNA e alteração do programa de PCR obtiveram-se bandas fortes com intensidades semelhantes entre si para todos os triplicados das amostras de solo de árvores saudáveis e doentes (Figura 17).

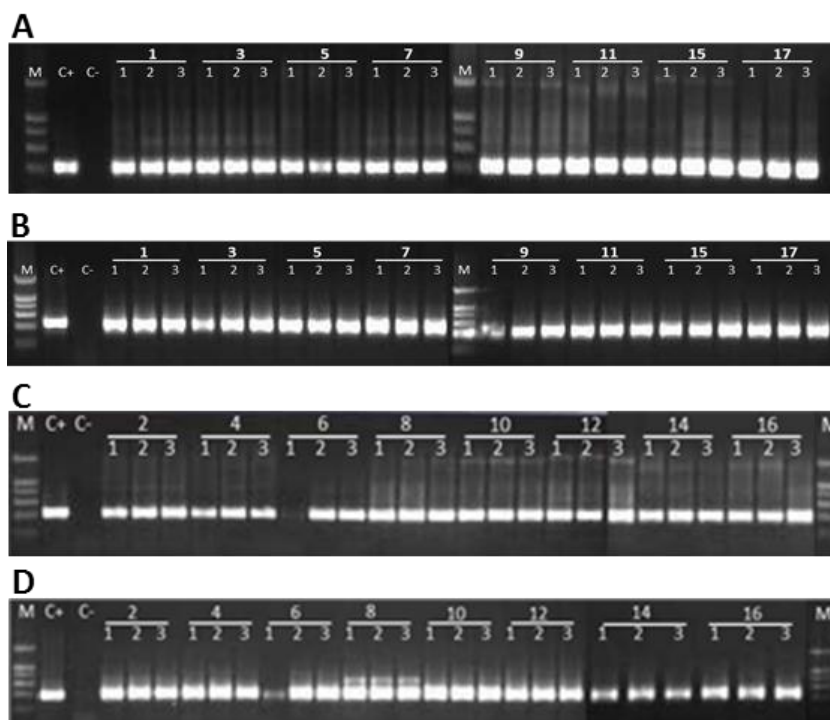


Figura 17. Géis de agarose (1%) dos produtos de PCR obtidos para DGGE. Sobreiros saudáveis: (A) região V6, (B) região ITS II; sobreiros decrépitos: (C) região V6, (D) região ITS II. C+: controlo positivo (DNA genómico de *Rubrobacter sp.* ou *Saccharomyces cerevisiae*); C-: controlo negativo; os números correspondem aos triplicados de cada amostra; M: marcador de peso molecular 1 Mbp.

No entanto o triplicado 6.1D não amplificou corretamente para ambas as regiões e, de forma a diminuir a concentração de possíveis inibidores, foram realizadas diluições desta amostra. Na diluição de 1:10 obteve-se uma banda com intensidade satisfatória (Figura 18), indicando desta forma a presença de inibidores, uma vez que para a diluição 1:1 não se obteve qualquer produto de PCR e para a diluição de 1:100 o DNA estava demasiado diluído (Figura 18).

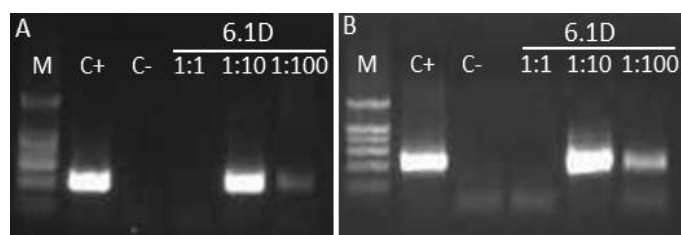


Figura 18. Géis de agarose (1%) dos produtos de PCR do triplicado 6.1D após diluição de 1:1, 1:10 e 1:100. (A) região V6; (B) região ITS II. C+: controlo positivo (DNA genómico de *Rubrobacter sp.* ou *Saccharomyces cerevisiae*); C-: controlo negativo; os números correspondem aos triplicados de cada amostra; M: marcador de peso molecular 1 Mbp.

Nos géis com gradiente de desnaturação foram carregados cerca de 20 μ L de cada amostra, uma vez que na quantificação dos produtos de PCR por fluorimetria não foram verificadas diferenças significativas nas concentrações médias de DNA: $52,47 \pm 7,90$ ng/mL (região V6, sobreiros saudáveis), $49,57 \pm 5,52$ ng/mL (região ITS II, sobreiros saudáveis), $45,75 \pm 9,32$ ng/mL (região V6, sobreiros decrépitos) e $48,20 \pm 3,67$ ng/mL (região ITS II, sobreiros decrépitos).

Os perfis de DGGE obtidos para comparação da população de microrganismos presente em árvores saudáveis e doentes estão representados na Figura 19. Pode observar-se um elevado número de bandas, indicando desta forma que as amostras do solo apresentam uma elevada diversidade microbiana, verificando-se uma elevada reprodutibilidade entre os triplicados de cada amostra.

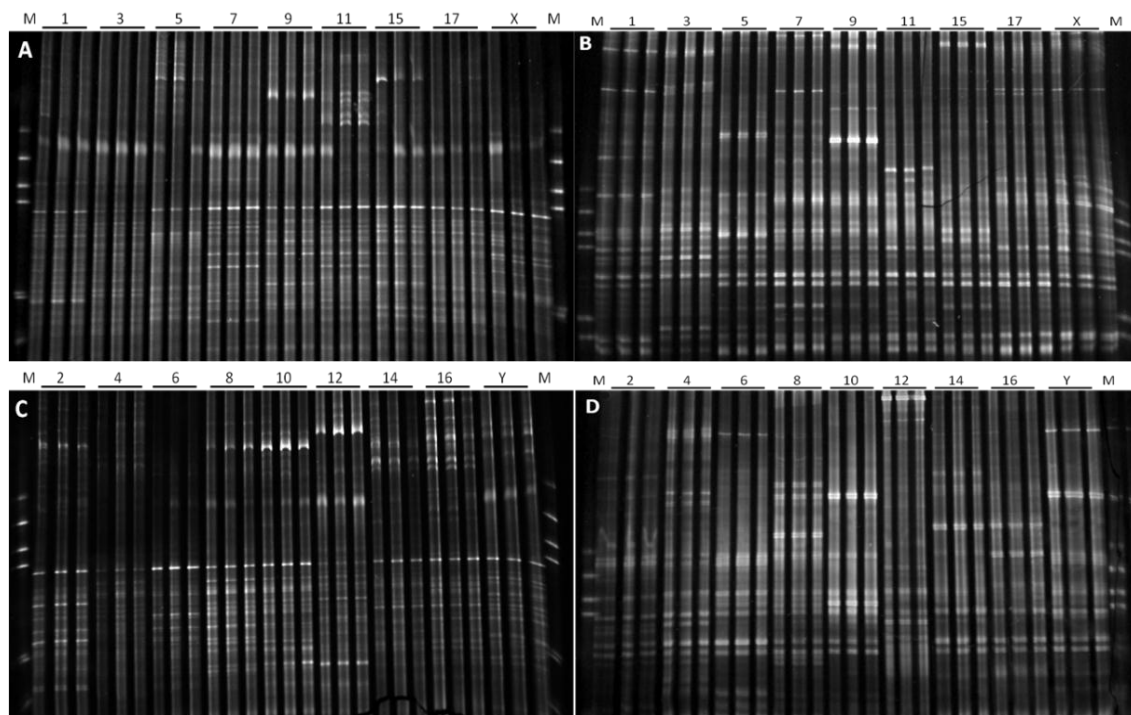


Figura 19. Perfis de DGGE obtidos das amostras de solo de sobreiros. Sobreiros saudáveis: (A) região V6, (B) região ITS II; sobreiros decrépitos: (C) região V6, (D) região ITS II.

A partir dos perfis de DGGE obtidos em cada gel foram construídos dendrogramas (Figura 20), utilizando o coeficiente de correlação de Pearson, para construção das matrizes de similaridade, e o método UPGMA, para agrupamento hierárquico dos perfis de DGGE.

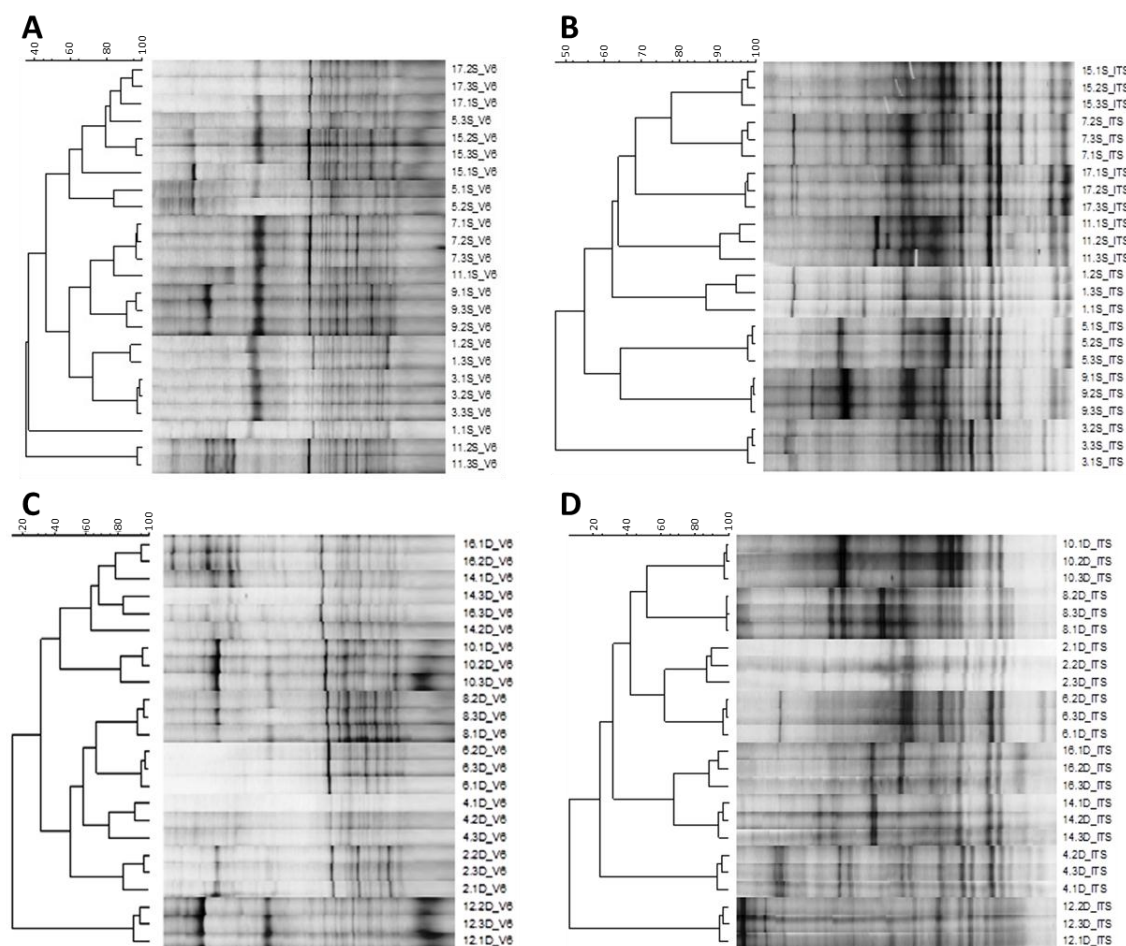


Figura 20. Dendrogramas construídos a partir dos perfis genéticos obtidos usando o coeficiente de Pearson e o UPGMA para agrupamento das amostras. Sobreiros saudáveis: (A) região V6, (B) região ITS II; sobreiros decrépitos: (C) região V6, (D) região ITS II.

A similaridade entre amostras de cada um dos grupos é elevada, verificando-se um agrupamento de quase todos os triplicados (com exceções na região V6, onde os triplicados 1.1S, 5.3S, 11.1S, 14.2D e 16.3D não se agrupam com os seus respetivos), demonstrando-se desta forma que as amostras compostas são homogêneas. A amostra 12D apresenta um perfil de DGGE bastante diferente das restantes amostras do mesmo grupo, podendo esta diferença ser explicada pela zona de recolha, pois na proximidade existia um charco e o solo desta era bastante barroso. Assim, como demonstrado em estudos anteriores (Marschner *et al.*, 2001; Singh *et al.*, 2007), as características do solo podem ter influenciado a estrutura da comunidade microbiana, que por consequência

influenciaram os perfis de DGGE. Pela análise dos dendrogramas verifica-se que as amostras tendem a agrupar segundo a zona de recolha (Figura 21), sendo este um fator de influência na estrutura e diversidade das comunidades microbianas (Lombard *et al.*, 2011). Vários estudos têm mostrado variações espaciais na composição da comunidade microbiana (Lauber *et al.*, 2008; Yergeau *et al.*, 2010), em particular um estudo onde foram usadas diferentes escalas espaciais (amostragem com intervalos de distância entre 2,5 cm a 11 m), tendo os autores demonstrado que as comunidades microbianas podem ter vários níveis particulares de organização, e que estes podem ser dependentes das diferentes propriedades do solo ou de grupos de propriedades (Franklin *et al.*, 2003).

Os parâmetros de diversidade e distribuição de espécies foram determinados, obtendo-se índices de Shannon bastante elevados para todas as amostras, estando compreendidos entre 5,459 e 5,871 (Tabela 4). A equitatividade (grau de dominância de espécies na comunidade microbiana) apresenta valores elevados (Tabela 4) indicando desta forma que a população de bactérias e de fungos presente no solo dos sobreiros é bastante homogênea. O número de espécies foi também estimado observando-se, tanto para árvores saudáveis como para doentes, uma maior diversidade na população de fungos em comparação com a população de bactérias, estando estes valores em conformidade com os índices de Shannon (Tabela 4). Os resultados obtidos suportam a riqueza de espécies presente no solo, um dos ambientes na Terra mais diversos em termos de diversidade microbiana (Torsvik *et al.*, 1990; Gans *et al.*, 2005; Schloss *et al.*, 2006).

Tabela 4. Índices de Shannon, equitatividade e número de espécies calculados a partir dos perfis de DGGE (média \pm desvio-padrão).

Grupo	Bactérias		Fungos	
	Saudável	Doente	Saudável	Doente
Índice de Shannon	5,634 \pm 0,075	5,459 \pm 0,202	5,871 \pm 0,042	5,834 \pm 0,097
Equitatividade	0,937 \pm 0,011	0,921 \pm 0,025	0,931 \pm 0,005	0,931 \pm 0,012
Número de espécies	410 \pm 14	377 \pm 33	546 \pm 11	527 \pm 18

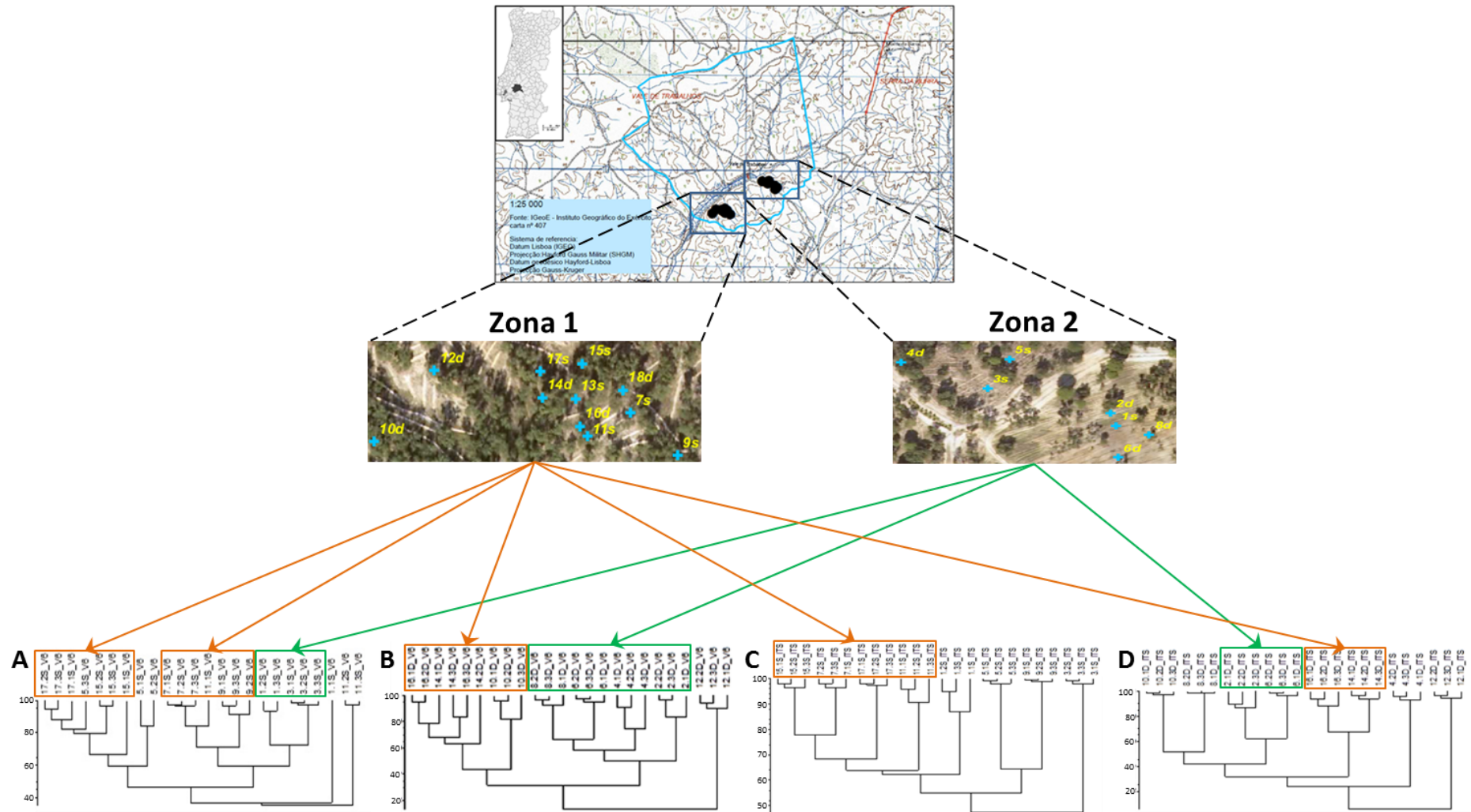


Figura 21. Influência da zona de recolha no agrupamento dos perfis de DGGE das amostras de solo de sobreiros saudáveis (A: região V6; C: região ITS II) e de sobreiros decrépitos (B: região V6; D: região ITS II). As setas a laranja correspondem à zona 1 e as setas a verde à zona 2.

O principal objetivo da DGGE neste trabalho foi a sua utilização como abordagem preliminar para averiguar a existência de diferenças entre o microbioma do solo de sobreiros saudáveis e doentes. Na Figura 22 são apresentados os gráficos tridimensionais de “scores” da PCA, onde foram utilizadas as curvas densitométricas geradas pelos perfis de DGGE, verificando-se uma clara separação entre amostras de sobreiros saudáveis e doentes, tanto para a região V6 como para o ITS II. Quando comparada a dispersão das amostras entre o grupo das bactérias e dos fungos, verifica-se para o primeiro uma maior dispersão, indicando desta forma uma maior variabilidade dos perfis de DGGE que são influenciados pela estrutura e diversidade das comunidades microbianas presentes nas amostras.

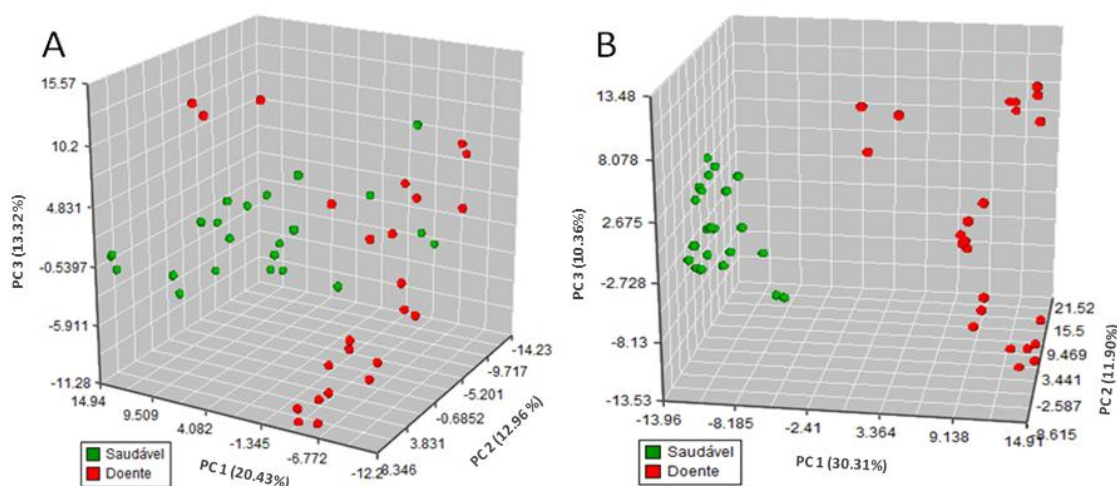


Figura 22. Análise por componentes principais demonstrando uma clara separação entre perfis genéticos adquiridos por DGGE para a região V6 (A) e ITS II (B). Em cada eixo é apresentada a percentagem de variabilidade explicada por cada componente.

No entanto, devido à baixa reprodutibilidade da técnica de DGGE (Nakatsu, 2007), a separação entre os dois grupos de amostras (quer para bactérias quer para fungos) pode ser devida à influência da variação do gradiente dos géis e não apenas pela composição e estrutura microbiana presente nas amostras de solo.

3.4 Pirosequenciação

Na seleção das amostras para sequenciação foi tido em conta o estado de decrepitude dos sobreiros e a zona de recolha, tendo-se criado os seguintes grupos: árvores saudáveis da zona de recolha 1 (7S, 9S, 11S, 15S e 17S); árvores saudáveis da zona de recolha 2 (1S, 3S e 5S); Árvores doentes da zona de recolha 1 (10D, 12D, 14D e 16D); Árvores doentes da zona de recolha 2 (2D, 4D, 6D e 8D). De cada grupo foram seleccionadas 3 amostras para sequenciar (12 amostras no total) com base nos dados obtidos na DGGE. Para o grupo de árvores saudáveis da zona 2 não foi necessária seleção, uma vez que este grupo é constituído por 3 amostras. Para os restantes grupos foram seleccionadas 2 amostras que apresentavam uma elevada similaridade entre si e uma amostra que apresentava uma similaridade inferior às duas amostras seleccionadas. Assim, no grupo de árvores saudáveis da zona 1 foram seleccionadas as amostras 9S, 15S e 17S, para o grupo de árvores doentes da zona de recolha 2 foram escolhidas as amostras 4D, 6D e 8D, e para o grupo de árvores doentes da zona 1 foram seleccionadas as amostras 12D, 14D e 16D (Figura 23).

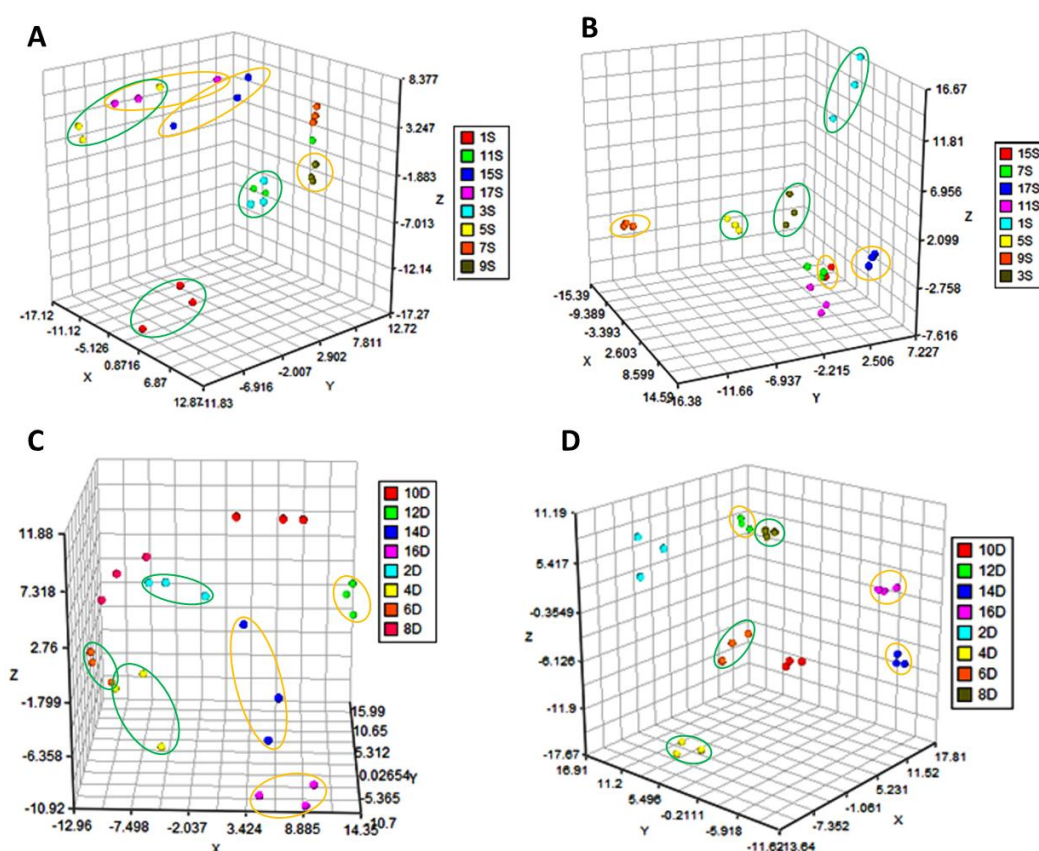


Figura 23. Seleção das amostras a sequenciar através da análise por componentes principais. Os círculos laranja indicam as amostras recolhidas na zona 1 e os círculos a verde indicam as amostras recolhidas na zona 2. Amostras saudáveis: (A) bactérias, (B) fungos; amostras doentes: (C) bactérias, (D) fungos.

Na construção das bibliotecas de amplicões foram obtidas bandas com um tamanho de cerca de 450 pb para a região V6 e ITS II, como esperado (Figura 24). Entre as amostras verificaram-se diferenças nas intensidades das bandas que podem ser devidas à presença de inibidores de PCR e/ou diferenças nas concentrações iniciais de DNA. Após a purificação das bibliotecas procedeu-se à avaliação da qualidade das mesmas, tendo-se obtido resultados satisfatórios, uma vez que apenas foi detetada uma única banda no gel, confirmando-se assim a remoção dos “primers” usados no PCR.

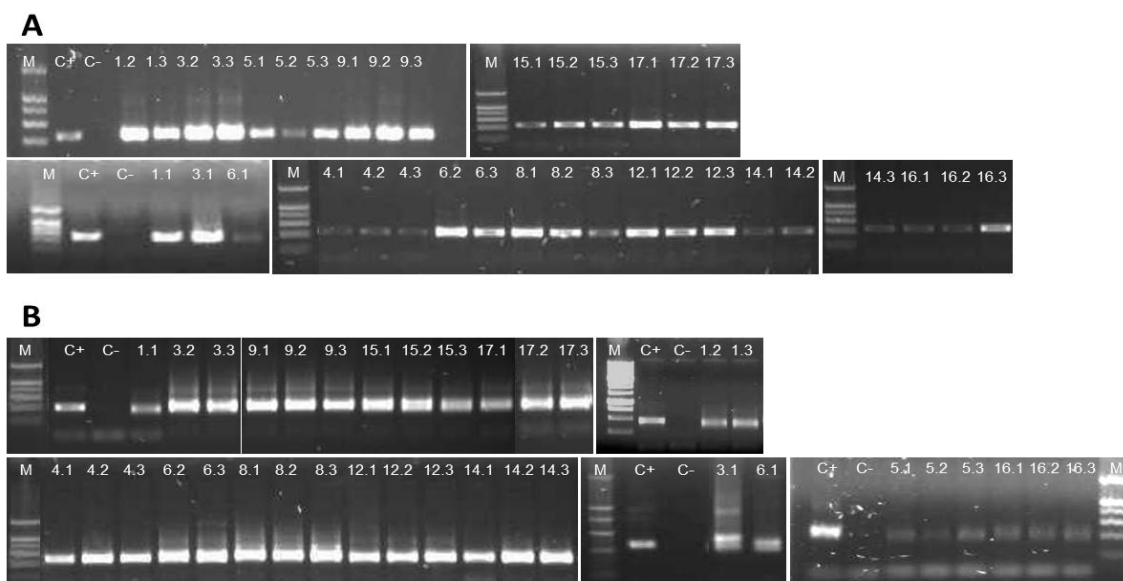


Figura 24. Géis de agarose (1%) dos produtos de PCR obtidos na construção das bibliotecas de amplicões para as regiões V6 (A) e ITS II (B). C+: controlo positivo (DNA genómico de *Rubrobacter sp.*); C-: controlo negativo; os números correspondem aos triplicados de cada amostra; M: marcador de peso molecular 1 Mbp.

Na Tabela 5 são apresentados os resultados obtidos na pirosequenciação após o processamento dos dados. Um total de 193657 sequências foi gerado, tendo uma

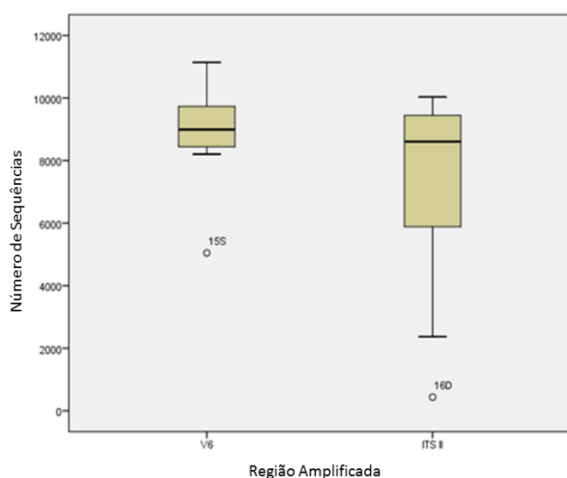


Figura 25. Distribuição do número de sequências geradas na sequenciação para as regiões V6 e ITS II. Os pontos representam “outliers”.

distribuição média de 8949 e 7189 sequências para as regiões V6 e ITS II, respetivamente. O número de sequências gerado nas amostras 15S e 16D para as regiões V6 e ITS II, respetivamente, foi inferior à média uma vez que se verifica a presença de “outliers” na caixa de bigodes apresentada na Figura 25, correspondendo estes às duas amostras anteriormente referidas. A percentagem de sequências que passou os parâmetros de qualidade foi

bastante elevada para ambas as regiões amplificadas. Todas as sequências com uma distância inferior a 3% foram agrupadas tendo sido geradas, em média, 1303 e 523 OTUs para a região V6 e ITS II, respetivamente. Para a região V6, quase todas as OTUs geradas passaram nos controlos de qualidade, enquanto para a região ITS II este número foi um pouco inferior. Por fim, procedeu-se à atribuição taxonómica das OTUs, obtendo-se valores médios de 79,8 % e de 100% de OTUs identificadas para a região V6 e ITS II, respetivamente.

Tabela 5. Números gerados na sequenciação e processamento de dados para as amostras de solo de sobreiros saudáveis e decrépitos.

Amostra	Região Amplificada	# Total de Sequências	# Sequências ¹	% Sequências ¹	# Total de OTU	# OTU ¹	% OTU ¹	% OTU Identificadas
1S	V6	9164	8922	97,4	1306	1261	96,6	82,0
3S	V6	8801	8484	96,4	1529	1466	95,9	78,5
5S	V6	10617	10364	97,6	1383	1347	97,4	81,4
9S	V6	8439	8195	97,1	977	933	95,5	79,2
15S	V6	5047	4927	97,6	887	868	97,9	82,8
17S	V6	8207	8016	97,7	1509	1397	92,6	80,3
4D	V6	11143	10878	97,6	1651	1584	95,9	77,3
6D	V6	9227	8976	97,3	1321	1221	92,4	79,8
8D	V6	8825	8624	97,7	1200	1140	95,0	79,3
12D	V6	8451	8239	97,5	1295	1239	95,7	77,2
14D	V6	9595	9392	97,9	1442	1413	98,0	79,1
16D	V6	9876	9653	97,7	1134	1080	95,2	80,6
1S	ITS II	5603	5239	93,5	455	331	72,7	100
3S	ITS II	9396	8523	90,7	725	482	66,5	100
5S	ITS II	2367	2253	95,2	205	160	78,0	100
9S	ITS II	8717	7890	90,5	385	280	72,7	100
15S	ITS II	6166	5471	88,7	304	234	77,0	100
17S	ITS II	7046	6386	90,6	600	379	63,2	100
4D	ITS II	9498	8925	94,0	591	380	64,3	99,7
6D	ITS II	10035	8995	89,6	580	362	62,4	100
8D	ITS II	9000	8303	92,3	375	293	78,1	100
12D	ITS II	9503	8789	92,5	538	329	61,2	100
14D	ITS II	8499	7829	92,1	673	413	61,4	100
16D	ITS II	435	370	85,1	87	65	74,7	100

¹ Após o respetivo controlo de qualidade

3.4.1 Análise da Riqueza Microbiana

Para cada uma das amostras foram construídas curvas de rarefação a uma distância filogenética de 3% (Figura 26), de forma a averiguar a riqueza de espécies presente nas amostras (Stackebrandt *et al.*, 1994). Nestas curvas verifica-se que com o aumento do número de sequências, o número de OTUs geradas aumenta e quando a curva atinge a saturação (“plateau”) significa que toda a diversidade microbiana presente na amostra foi caracterizada (Siqueira *et al.*, 2012). Através dos valores de Chao1 esperado e Chao1 estimado apresentados na Tabela 6 foram calculadas as coberturas de diversidade (razão Chao1 estimado/Chao1 esperado), obtendo-se em média valores de 61,3% e 62,3%, para bactérias e fungos, respetivamente, mostrando desta forma que grande parte da diversidade de microrganismos presentes nas amostras foi caracterizada e portanto com o aumento do número de sequências, o número de OTUs não iria sofrer grandes alterações. Quando comparadas as curvas de rarefação entre o grupo das bactérias (Figura 27A e C) e dos fungos (Figura 27B e D) verifica-se que a diversidade de bactérias presentes nas amostras é aproximadamente o triplo da diversidade dos fungos, para um mesmo número de sequências obtidas.

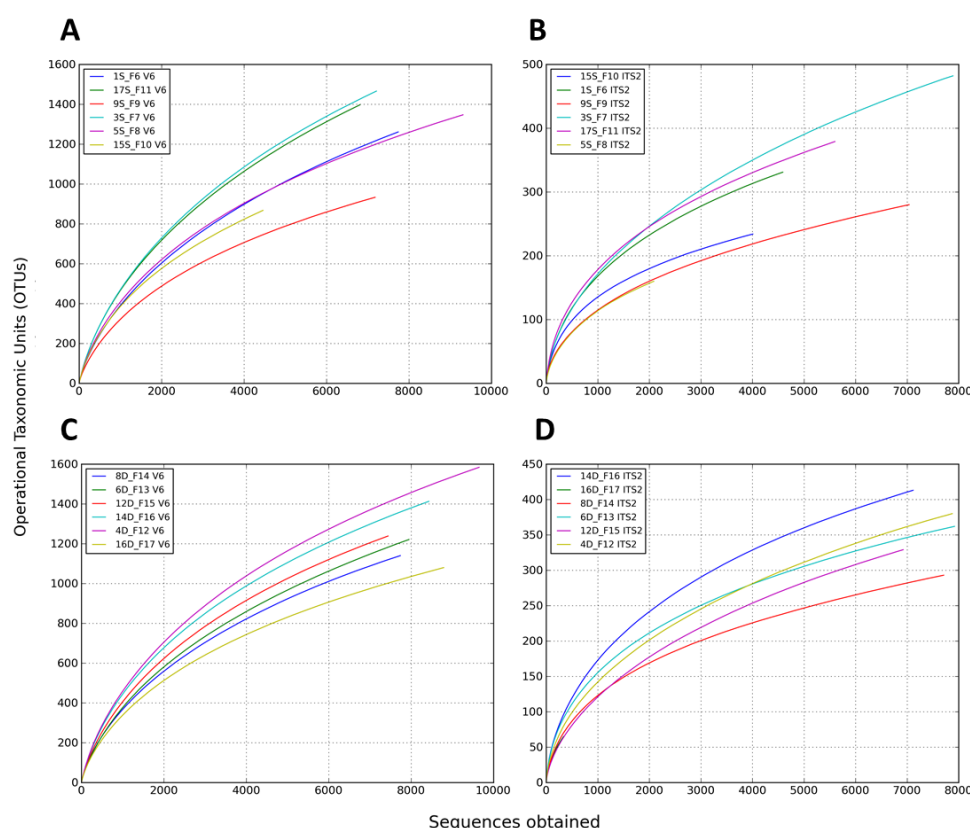


Figura 26. Curvas de rarefação indicando o número de OTU observados pelo número de sequências obtidas, a uma distância filogenética de 3%. Árvores saudáveis: (A) região V6 e (B) região ITS II; árvores doentes: (C) região V6 e (D) região ITS II.

Na Tabela 6 é apresentado o número de espécies esperado e estimado pelo Chao1 usando uma distância de 97% (Chao *et al.*, 2005). Em todos verifica-se uma maior diversidade de espécies de bactérias quando comparada com a dos fungos, e não são observadas diferenças médias significativas entre árvores saudáveis e doentes para a mesma região amplificada.

Tabela 6. Estimativa do número de espécies esperado, espécies obtido e cobertura da diversidade (%) (distância filogenética de 3%) por amostra e região amplificada através do estimador de riqueza Chao1.

Amostra	Região Amplificada	Chao1	
		# Espécies esperado	# Espécies estimado
1S	V6	2139	1261
3S	V6	2460	1466
5S	V6	2165	1347
9S	V6	1544	933
15S	V6	1466	868
17S	V6	2284	1397
4D	V6	2440	1584
6D	V6	2164	1221
8D	V6	1798	1140
12D	V6	1922	1239
14D	V6	2257	1413
16D	V6	1751	1080
1S	ITS II	497	331
3S	ITS II	762	482
5S	ITS II	278	160
9S	ITS II	526	280
15S	ITS II	342	234
17S	ITS II	607	379
4D	ITS II	595	380
6D	ITS II	547	362
8D	ITS II	493	293
12D	ITS II	520	329
14D	ITS II	615	413
16D	ITS II	116	65

De salientar que as amostras 5S e 16D para a região ITS II apresentam um número de espécies bastante inferior às restantes amostras, podendo estes resultados estar influenciados pela construção das bibliotecas de amplicões, uma vez que a eficiência de amplificação foi inferior quando comparada com as restantes amostras.

3.4.2 Distribuição Taxonómica

De forma a verificar a distribuição taxonómica foi utilizada a ferramenta online iTOL (Letunic *et al.*, 2011) para construção das árvores filogenéticas a partir das OTUs identificadas para o grupo das bactérias e fungos.

Na Figura 27 é apresentada a árvore filogenética para o domínio Bacteria, onde um nó corresponde a um taxa identificado nas amostras de solo de árvores saudáveis e/ou doentes, e no final de cada ramo é descrito o último taxa de cada grupo identificado a partir das OTUs geradas. É observada uma elevada diversidade a todos os níveis filogenéticos, nomeadamente no filo *Proteobacteria*, *Actinobacteria* e *Firmicutes*, e uma menor diversidade nos *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia*, *Chlamydiae* e *Acidobacteria*. Os filos *Gemmatimonadetes*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Chlorobi*, *Nitrospirae*, *Fusobacteria*, *Cyanobacteria*, *Tenericutes* e *Elusimicrobia* foram colocados no grupo artificial “Others” uma vez que a diversidade destes é reduzida.

A abundância relativa de cada filo está representada na Figura 28, observando-se uma distribuição bastante homogénea entre amostras do mesmo grupo (saudável e doente) assim como entre os dois grupos, não se verificando diferenças evidentes entre o microbioma das árvores saudáveis e doentes ao nível do filo. Todas as amostras de solo de árvores saudáveis e doentes são dominadas pelo filo *Proteobacteria* (44,32%), estando este resultado em concordância com estudos anteriormente publicados (Roesch *et al.*, 2007; Fulthorpe *et al.*, 2008; Uroz *et al.*, 2010). As amostras são também caracterizadas pelos filos *Actinobacteria* (17,32%), *Verrucomicrobia* (14,32%), *Acidobacteria* (8,22%), *Planctomycetes* (5,17%), *Firmicutes* (5,09%), *Gemmatimonadetes* (0,72%). No entanto, Acosta-Martínez *et al.* (2008) verificaram uma predominância de *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* e *Firmicutes* em solos livres de práticas de cultivo. Os filos *Bacteroidetes*, *Fibrobacteres*, *Chlorobi*, *Fusobacteria*, *Cyanobacteria*, *Tenericutes*, *Elusimicrobia*, *Chlamydiae*, *Chloroflexi* e *Nitrospirae* apresentavam uma abundância relativa inferior a 0.5% e portanto foram agrupados no grupo artificial “Other”, tendo este uma abundância relativa média final de 1,14%. De salientar que apenas 3,70% das sequências da região V6 são desconhecidas (“Unclassified Bacteria”), sendo este valor bastante reduzido.

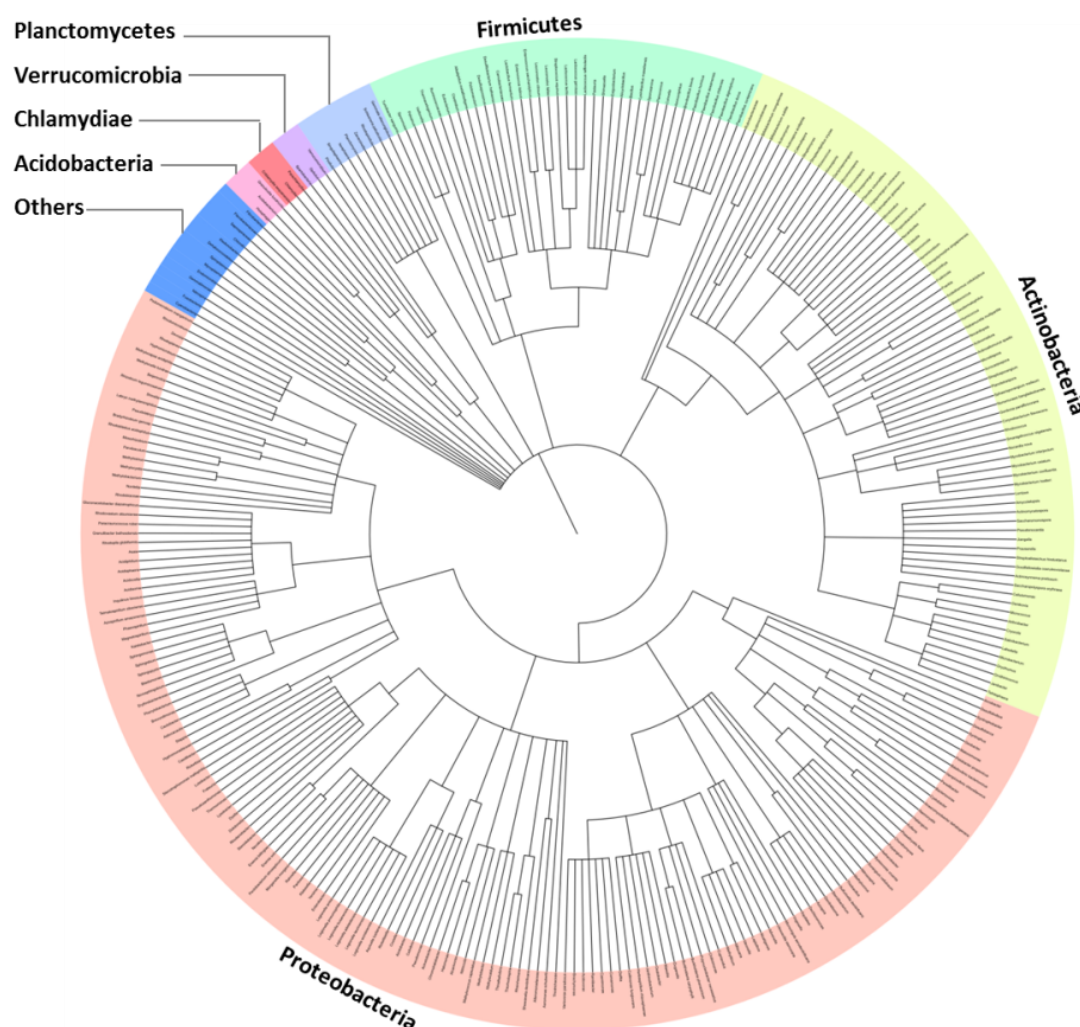


Figura 27. Árvore filogenética do domínio Bacteria, verificando-se uma elevada diversidade de microrganismos identificados nas amostras de árvores saudáveis e doentes. As cores representam os filos identificados nas amostras de solo de árvores saudáveis e/ou doentes. O grupo artificial “Others” corresponde aos filos que apresentavam uma diversidade reduzida.

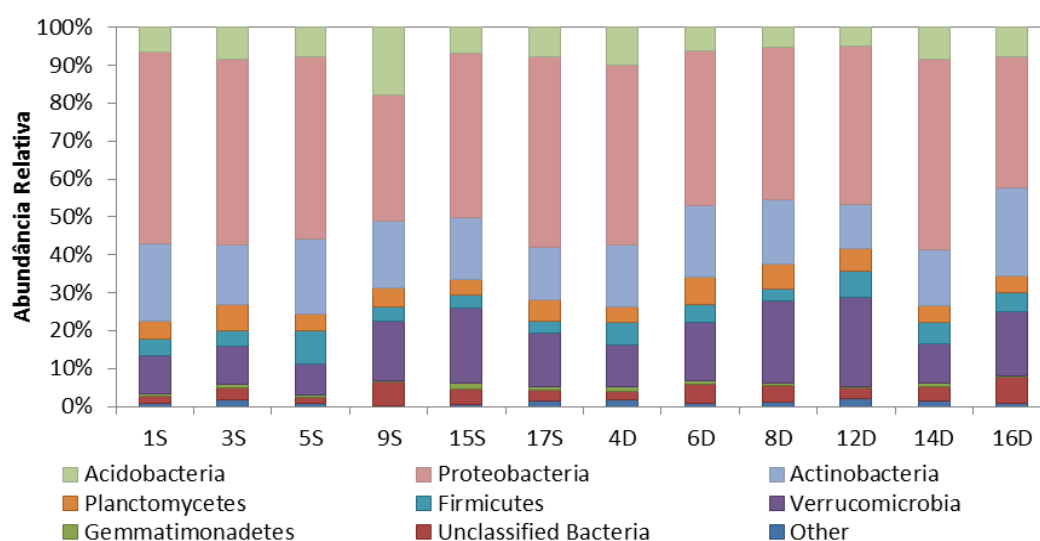


Figura 28. Abundância relativa dos grupos filogenéticos ao nível do filo das bactérias presentes nas amostras de solo. Os grupos filogenéticos com uma abundância relativa inferior a 0,5% foram agrupados no grupo “Other”.

Na árvore filogenética para o domínio Fungi observa-se uma grande diversidade a todos os níveis filogenéticos (Figura 30), nomeadamente no filo *Ascomycota*, *Basidiomycota* e “Early diverging fungal lineages”. Quanto à abundância relativa, os grupos que dominam as amostras de solo são os filios *Basidiomycota*, “Unclassified Fungi” e *Ascomycota* (Figura 31). Ao contrário do que acontece nas bactérias, a distribuição dos filios é menos homogénea entre as amostras. A dominância é partilhada entre os filios *Basidiomycota* e “Unclassified Fungi”, estando o primeiro presente com maior abundância nas amostras 1S, 3S, 5S, 9S, 4D, 8D, 12D e 16D, e o segundo nas restantes nas amostras (15S, 17S, 6D e 14D). No entanto, em média, verifica-se uma dominância do filo *Basidiomycota* (46,3%), seguindo-se os filios “Unclassified Fungi” (31,2%) e *Ascomycota* (19,2%). Assim, verifica-se que apesar do filo *Ascomycota* apresentar uma maior diversidade de espécies, é o filo *Basidiomycota* que domina as amostras de solo. Tanto para as amostras de solo de árvores saudáveis e doentes verifica-se uma maior abundância de sequências desconhecidas (32,54%, em média; “Unclassified Fungi”) quando comparada com as bactérias. Este resultado pode dever-se ao facto das bases de dados para a região ITS II não serem tão ricas quando comparadas às bases de dados para sequências bacterianas. O grupo “Other” apresenta uma abundância relativa de 0,12%, e é constituído pelos filios *Glomeromycota* e *Chytridiomycota*, uma vez que estes apresentavam uma abundância relativa inferior a 0,5%.

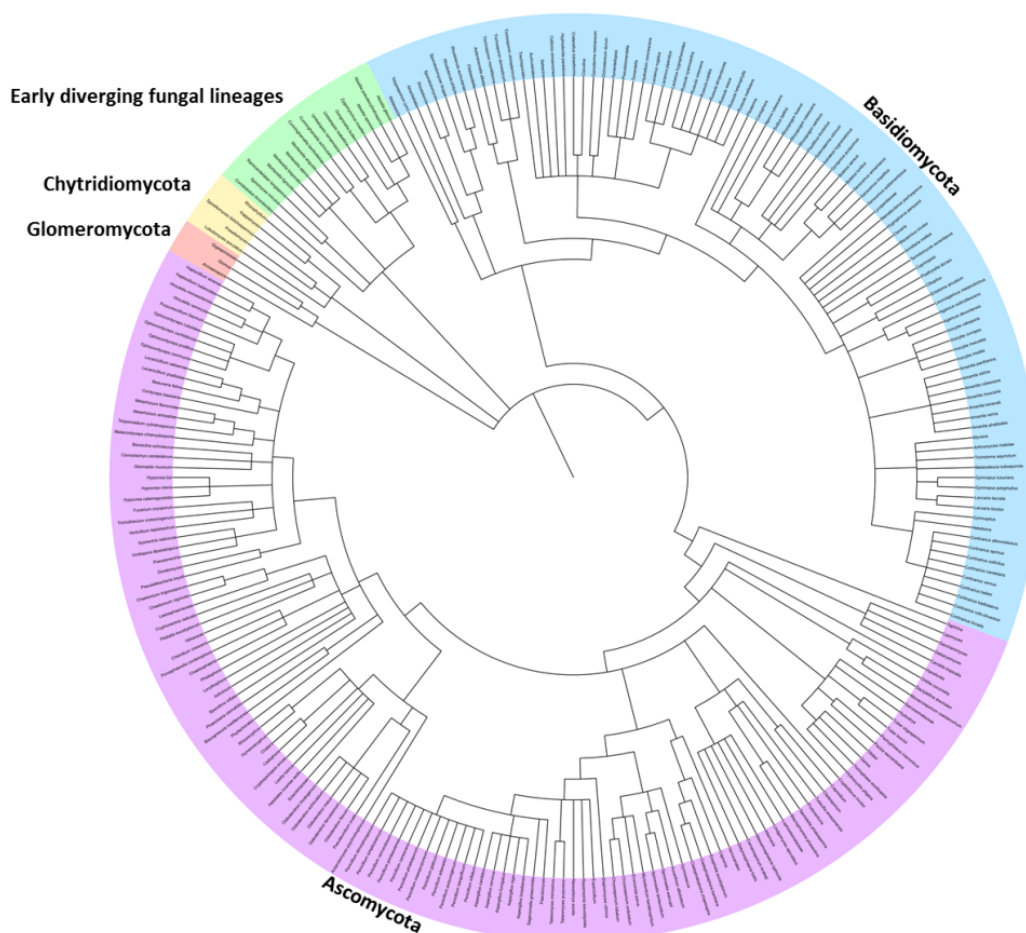


Figura 29. Árvore filogenética do domínio Fungi dos microrganismos identificados nas amostras de árvores saudáveis e doentes. As cores representam os filos identificados nas amostras de solo de árvores saudáveis e/ou doentes.

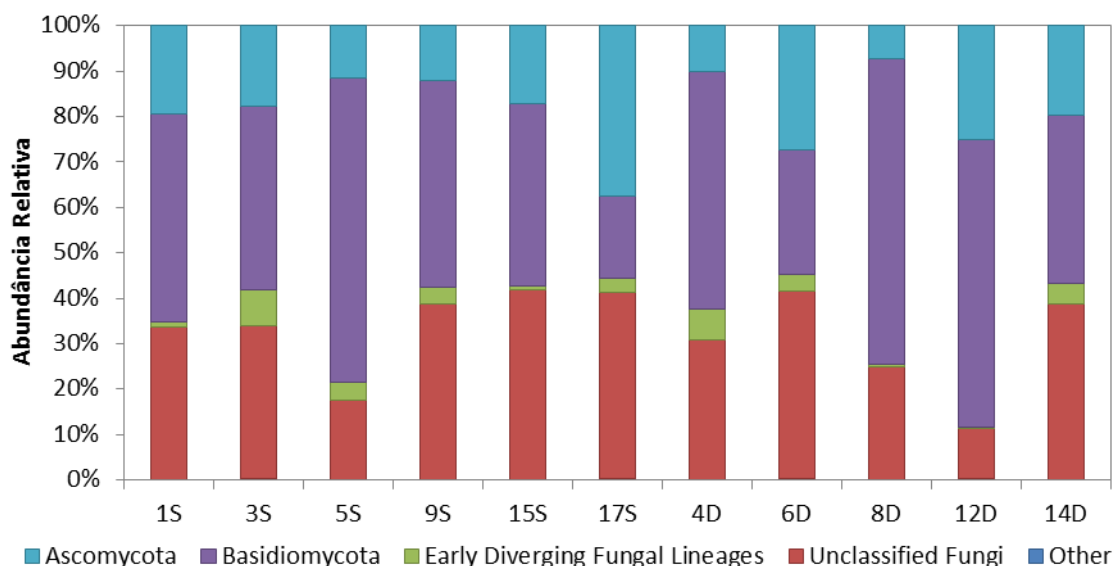


Figura 30. Abundância relativa dos grupos filogenéticos ao nível do filo dos fungos presentes nas amostras de solo. Os grupos filogenéticos com uma abundância relativa inferior a 0,5% foram agrupados no grupo “Other”.

Os vinte e cinco géneros de bactérias e fungos mais abundantes nas amostras de solo estão representados na Tabela 7, correspondendo o número total de sequências à soma de todas as sequências obtidas para cada microrganismo presente nas amostras.

Tabela 7. Vinte e cinco géneros de fungos e bactérias predominantes nas amostras de solo de árvores saudáveis e doentes. O número total de sequências corresponde à soma das sequências obtidas em cada amostra para cada um dos organismos.

# Total Sequências	Género (fungo)	# Total Sequências	Género (bactéria)
8322	<i>Cortinarius spp.</i>	4734	<i>Mycobacterium spp.</i>
3520	<i>Tricholoma spp.</i>	3252	<i>Steroidobacter spp.</i>
3017	<i>Russula spp.</i>	1084	<i>Bradyrhizobium spp.</i>
2051	<i>Mortierella spp.</i>	781	<i>Actinoallomurus spp.</i>
1803	<i>Oidiodendron spp.</i>	512	<i>Planctomyces spp.</i>
1757	<i>Lactarius spp.</i>	508	<i>Lactococcus spp.</i>
1544	<i>Penicillium spp.</i>	484	<i>Bacillus spp.</i>
1489	<i>Inocybe spp.</i>	398	<i>Streptococcus spp.</i>
949	<i>Amanita spp.</i>	375	<i>Geobacter spp.</i>
761	<i>Scleroderma spp.</i>	347	<i>Leuconostoc spp.</i>
706	<i>Elaphomyces spp.</i>	337	<i>Phenylobacterium spp.</i>
631	<i>Craterellus spp.</i>	327	<i>Paenibacillus spp.</i>
534	<i>Aspergillus spp.</i>	320	<i>Pseudonocardia spp.</i>
509	<i>Xerocomus spp.</i>	315	<i>Pseudomonas spp.</i>
412	<i>Hygrophorus spp.</i>	308	<i>Streptomyces spp.</i>
404	<i>Tomentella spp.</i>	299	<i>Isosphaera spp.</i>
366	<i>Hypocrea spp.</i>	238	<i>Legionella spp.</i>
199	<i>Cladophialophora spp.</i>	208	<i>Leptothrix spp.</i>
168	<i>Gymnopus spp.</i>	204	<i>Variovorax spp.</i>
162	<i>Hydnellum spp.</i>	191	<i>Caulobacter spp.</i>
149	<i>Hansfordia spp.</i>	173	<i>Actinospica spp.</i>
149	<i>Umbelopsis spp.</i>	154	<i>Gemmata spp.</i>
141	<i>Clavulina spp.</i>	139	<i>Kribbella spp.</i>
124	<i>Boletus spp.</i>	128	<i>Ammoniphilus spp.</i>
121	<i>Astraeus spp.</i>	128	<i>Dyella spp.</i>

Desta forma verifica-se que os géneros de fungos que caracterizam as amostras de solo são maioritariamente cogumelos, estando também presentes ectomicorrizas, fungos saprófitas e produtores de antibióticos. A presença de uma elevada diversidade e abundância de cogumelos era esperada uma vez que o solo apresentava uma elevada diversidade e quantidade de cogumelos quando se procedeu à recolha das amostras. Nas bactérias observa-se uma gama de funções bastante diversificada, sendo este grupo caracterizado por bactérias que participam no ciclo do azoto, produtoras de antibióticos, ácido lácticas, promotoras do crescimento das plantas, entre outras.

3.4.3 Comparação dos Microbiomas do Solo

Na comparação da população de microrganismos foi utilizada a ferramenta online *Metastats* (White *et al.*, 2009) de forma a identificar diferenças estatisticamente significativas entre o microbioma do solo de árvores saudáveis e doentes. Nas Tabelas 8 e 9 são apresentados os microrganismos que diferem significativamente (p-value < 0,05) entre as duas populações de amostras, nos diferentes níveis taxonômicos.

Tabela 8. Microrganismos identificados nos diferentes níveis taxonômicos para o grupo das bactérias usando a ferramenta *Metastats* (p-value<0,05).

Nível Taxonômico	Nome	p-value	q-value
Classe	<i>Acidobacteriia</i>	0,022	0,965
Ordem	<i>Desulfobacterales</i>	0,006	0,302
	<i>Acidobacteriales</i>	0,019	0,424
	<i>Alteromonadales</i>	0,025	0,424
	<i>Neisseriales</i>	0,048	0,542
Família	<i>Nocardiodaceae</i>	0,005	0,690
	<i>Desulfobulbaceae</i>	0,007	0,690
	<i>Micromonosporaceae</i>	0,019	0,773
	<i>Shewanellaceae</i>	0,031	0,773
	<i>Leuconostocaceae</i>	0,032	0,773
	<i>Bacteriovoracaceae</i>	0,036	0,773
	<i>Neisseriaceae</i>	0,037	0,773
	<i>Propionibacteriaceae</i>	0,038	0,773
	<i>Rhodospirillaceae</i>	0,040	0,773
	<i>Rhodocyclaceae</i>	0,041	0,773
Gênero	<i>Microtholus</i>	0,005	1
	<i>Desulfobulbus</i>	0,009	1
	<i>Nonomuraea</i>	0,013	1
	<i>Leuconostoc</i>	0,014	1
	<i>Marmoricola</i>	0,018	1
	<i>Ramlibacter</i>	0,019	1
	<i>Mesorhizobium</i>	0,019	1
	<i>Hyphomicrobium</i>	0,030	1
	<i>Pelotomaculum</i>	0,030	1
	<i>Kineococcus</i>	0,030	1
	<i>Thioalkalivibrio</i>	0,030	1
	<i>Kribbella</i>	0,031	1
	<i>Cryocola</i>	0,033	1
	<i>Lactococcuslactis</i>	0,012	1
Espécie	<i>Nonomuraea bangladeshensis</i>	0,012	1
	<i>Leuconostoc citreum</i>	0,013	1
	<i>Enterococcus italicus</i>	0,027	1
	<i>Lactococcus raffinolactis</i>	0,030	1
	<i>Nakamurella multipartita</i>	0,030	1

Tabela 9. Microrganismos identificados nos diferentes níveis taxonómicos para o grupo dos fungos usando a ferramenta Metastats (p-value<0,05).

Nível Taxonómico	Nome	p-value	q-value
Classe	<i>Ustilaginomycetes</i>	0,034	1
	<i>Microbotryomycetes</i>	0,048	1
Ordem	<i>Atheliales</i>	0,013	0,912
	<i>Corticiales</i>	0,031	0,912
	<i>Ustilaginales</i>	0,032	0,912
	<i>Auriculariales</i>	0,032	0,912
Família	<i>Atheliaceae</i>	0,017	0,844
	<i>Corticaceae</i>	0,029	0,844
	<i>Bionectriaceae</i>	0,034	0,844
	<i>Mucoraceae</i>	0,035	0,844
	<i>Ustilaginaceae</i>	0,038	0,844
	<i>Sarcosomataceae</i>	0,038	0,844
	<i>Davidiellaceae</i>	0,038	0,844
	<i>Lophiostomataceae</i>	0,038	0,844
	<i>mitosporic Sporidiobolales</i>	0,044	0,862
Género	<i>Absidia</i>	0,012	1
	<i>Otidea</i>	0,019	1
	<i>Hymenoscyphus</i>	0,019	1
	<i>Tolyposporium</i>	0,041	1
	<i>Asterotremella</i>	0,041	1
	<i>Cladosporium</i>	0,041	1
	<i>Rhodotorula</i>	0,045	1
	<i>Lactarius</i>	0,046	1
Espécie	<i>Absidia spinosa</i>	< 0,010	0,041
	<i>Oidiodendron flavum</i>	< 0,010	0,062
	<i>Mortierella alpina</i>	< 0,010	0,365
	<i>Gymnopus polyphyllus</i>	< 0,010	0,365
	<i>Tolyposporium junci</i>	0,014	0,442
	<i>Asterotremella albida</i>	0,014	0,442
	<i>Cortinarius badiolaevis</i>	0,014	0,442
	<i>Penicillium purpurogenum</i>	0,014	0,442
	<i>Penicillium dimorphosporum</i>	0,014	0,442
	<i>Metacordyceps chlamydosporia</i>	0,015	0,442
	<i>Arthromyces matolae</i>	0,021	0,525
	<i>Hypocrea virens</i>	0,021	0,525
	<i>Chrysosporium undulatum</i>	0,024	0,550
	<i>Alpova rubescens</i>	0,041	0,780
	<i>Talaromyces purpureus</i>	0,041	0,780
	<i>Penicillium canescens</i>	0,042	0,780
	<i>Xerocomus armeniacus</i>	0,050	0,808

Tanto para o grupo das bactérias como dos fungos são identificados diversos microrganismos ao longo dos vários níveis taxonómicos com p-value inferior a 0,05. No entanto, estes resultados perdem significado estatístico uma vez que os q-values (parâmetro que mede a probabilidade do resultado ser um falso-positivo) obtidos são bastante elevados, com exceção para *Absidia spinosa* e *Oidiodendron flavum*. Estes dois fungos encontram-se em maior abundância no grupo de amostras de solo de árvores saudáveis. Para a *A. spinosa* obtiveram-se, em média, 9 e 4 sequências para amostras

saudáveis e doentes, respetivamente, e para o *O. Flavum* obtiveram-se, em média, 54 e 34 sequências para amostras saudáveis e doentes, respetivamente.

Posteriormente foram realizadas análises estatísticas para verificar a distribuição das amostras provenientes de solo de árvores saudáveis e decrépitas. Nas Figura 31 e 32 são apresentados os resultados obtidos, utilizando a análise por componentes principais, e o coeficiente de Pearson e o método UPGMA para construção dos dendrogramas. Nos dois tipos de análise verifica-se uma distribuição homogénea das amostras e portanto os resultados obtidos não suportam a diferenciação entre as amostras de solo de sobreiros saudáveis e de solo de sobreiros decrépitos obtidos por DGGE. Na Figura 33 é possível verificar que as amostras apresentam uma similaridade bastante elevada entre si, indicando desta forma que a comunidade bacteriana presente no solo de árvores saudáveis e doentes não apresenta quaisquer diferenças entre si quer no grupo das bactérias, quer no grupo dos fungos.

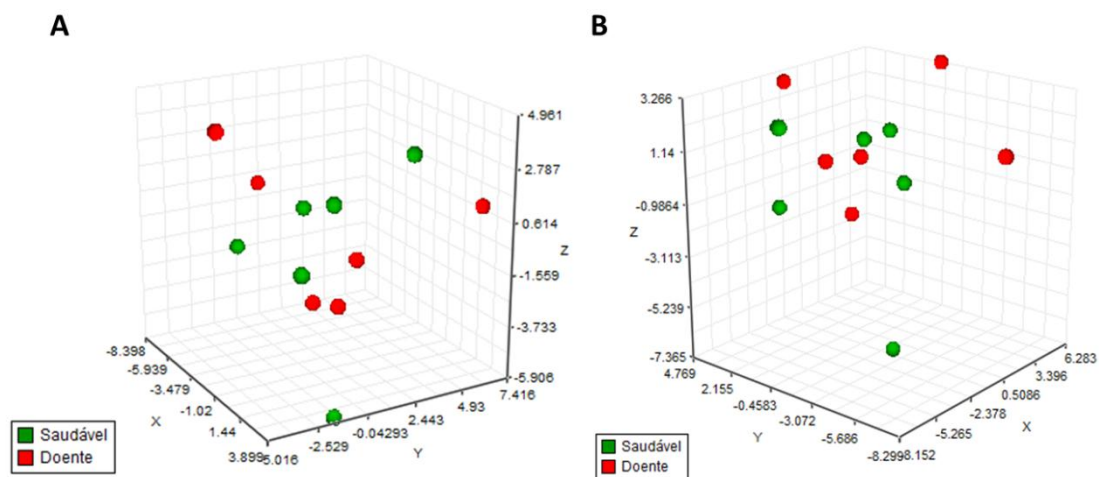


Figura 31. Análise por componentes principais para comparação das populações de bactérias (A) e fungos (B) entre as amostras de solo de árvores saudáveis e doentes.

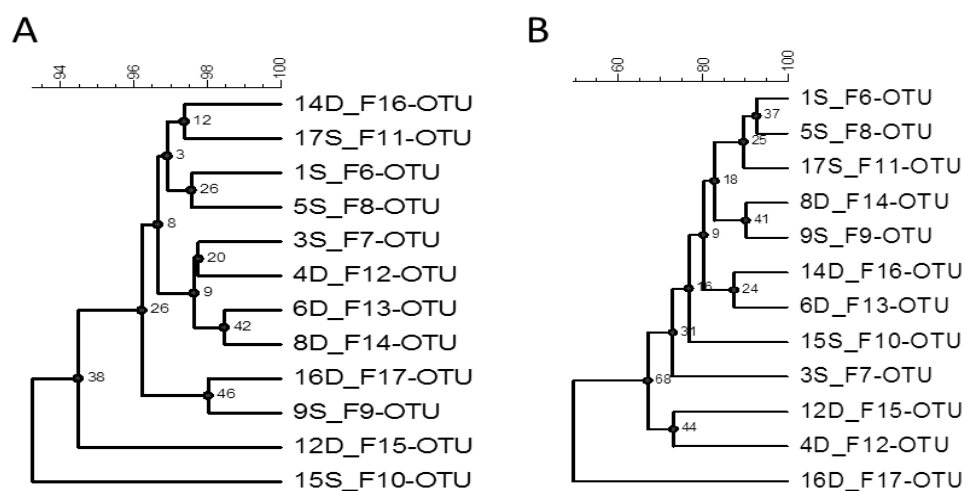


Figura 32. Dendrogramas para comparação das populações de bactérias (A) e fungos (B) entre as amostras de solo de árvores saudáveis e doentes. Os dendrogramas foram construídos usando o coeficiente de Pearson e o método UPGMA.

4 CONCLUSÕES

Neste trabalho pretendeu-se efetuar um estudo comparativo entre o microbioma de solo de sobreiros saudáveis e decrépitos e averiguar o efeito da doença na comunidade microbiana. O estudo incidiu sobre a população bacteriana e fúngica, aferidas através das técnicas de DGGE, como abordagem preliminar para comparação e agrupamento das amostras, e de pirosequenciação, para determinação da composição das comunidades microbianas presente nas amostras de solo.

O estudo revelou que ambas as comunidades microbianas apresentam uma elevada diversidade de espécies, sendo esta cerca de três vezes superior para bactérias, quando comparada com os fungos. A cobertura da diversidade foi estimada em 61,3% e 62,3% para bactérias e fungos, respetivamente, concluindo-se assim que uma grande parte da população de microrganismos presente no solo foi caracterizada. No caso das comunidades bacterianas verifica-se uma predominância de microrganismos pertencentes ao filo *Proteobacteria* para os dois tipos de solo, seguindo-se os filos *Actinobacteria*, *Verrucomicrobia* e *Acidobacteria*. Na população de fungos verifica-se, em média, que o filo mais representado foi o *Basidiomycota*, seguindo-se os filos “Unclassified Fungi” e *Ascomycota*. Na análise funcional do grupo dos fungos verificou-se a presença dominante de espécies de cogumelos, observando-se também ectomicorrizas, fungos saprófitas e produtores de antibióticos. No caso das bactérias os grupos funcionais foram aparentemente mais diversificados, encontrando-se bactérias que participam no ciclo do azoto, produtoras de antibióticos, ácido lácticas, promotoras do crescimento das plantas, entre outras.

O estudo comparativo entre o microbioma do solo de sobreiro saudável e do solo de sobreiro decrépito revelou diferenças usando a abordagem preliminar por DGGE. No entanto na pirosequenciação não foram observadas diferenças significativas, tanto na população de bactérias como na população de fungos, indicando desta forma que a separação das amostras observada em DGGE pode ter sido devida a diferenças de gradiente dos géis e não à população de microrganismos presentes nas amostras de solo. Este resultado pode indiciar que os exsudatos libertados pelas raízes das árvores não alteram de forma significativa a estrutura e composição das comunidades presentes no solo circundante às raízes (solo que não é penetrado pelas raízes das plantas).

No entanto, este trabalho possibilitou um avanço na compreensão da estrutura e composição das comunidades microbianas do solo de sobreiros, permitindo desta forma a caracterização global dos microrganismos presentes no solo do montado.

5 BIBLIOGRAFIA

- Acosta-Martínez, V.; Dowd, S.; Sun, Y. *et al.* (2008). "Tag-encoded pyrosequencing analysis of bacterial diversity in a single soil type as affected by management and land use". *Soil Biology and Biochemistry*. 40 (11): 2762-2770.
- AFN. (2010). "Relatório Final do 5.º Inventário Florestal Nacional".
- Ahmadian, A.; Ehn, M. and S., Hober. (2006). "Pyrosequencing: History, biochemistry and future". *Clinica Chimica Acta*. 363 83-94.
- Almeida, V. (1898). "Acerca dos montados de sobro". *Agricultura Contemporânea*. 8 (10): 375-381.
- Ansorge, W.J. (2009). "Next-generation DNA sequencing techniques". *New Biotechnology*. 25 (4): 195-203.
- APCOR. (2011). "Anuário da Cortiça".
- APCOR. (2011). "Distribuição do Montado a Nível Mundial". In: www.apcor.pt/artigo/271htm. (Acedido a 3 de Janeiro de 2012):
- Baker, G.C.; Smith, J.J. and Cowan, D.A. (2003). "Review and re-analysis of domain-specific 16S primers". *Journal of Microbiological Methods*. 55 541-555.
- Balci, Y. and Halmschlager, E. (2003). "Phytophthora species in oak ecosystems in Turkey and their association with declining oak trees". *Plant Pathology*. 52 (6): 694-702.
- Balci, Y. and Halmschlager, E. (2003a). "Incidence of *Phytophthora* species in oak forests in Austria and their possible involvement in oak decline". *Forest Pathology*. 33 157-174.
- Barbero, M.; Bonin, G.; Loisel, R. *et al.* (1990). "Changes and disturbances of forest ecosystems caused by human activities in the western part of the mediterranean basin". *Plant Ecology*. 87 (2): 151-173.
- Bertin, P.N.; Médigue, C. and Normand, P. (2008). "Advances in environmental genomics: towards an integrated view of micro-organisms and ecosystems". *Microbiology*. 154 (2): 347-359.
- Brasier, C.M. (1996). "Phytophthora cinnamomi and oak decline in southern Europe. Environmental constraints including climate change". *Annals of Forest Science*. 53 347-358.
- Brasier, C.M.; Moreira, A.C.; Ferraz, J.F.P. *et al.* 1993a. High mortality of cork oak in Portugal associated with *Phytophthora cinnamomi*. pp. 461-462. Luisi, N., Lerario, P. & Vannini, A., Bari, Itália.
- Brasier, C.M.; Robredo, F. and Ferraz, J.F.P. . (1993b). "Evidence for *Phytophthora cinnamomi* involvement in Iberian oak decline". *Plant Pathology*. 42 140-145.
- Buckley, D.H.; Graber, J.R. and Schmidt, T.M. (1998). "Phylogenetic analysis of nonthermophilic members of the kingdom *Crenarchaeota* and their diversity and abundance in soils". *Applied and Environmental Microbiology*. 64 (11): 4333-4339.

- Buyer, J.S.; Roberts, D.P. and Russek-Cohen, E. (2002). "Soil and plant effects on microbial community structure". *Canadian Journal of Microbiology*. 48 955-964.
- Câmara-Pestana, J. (1898). "Nova doença dos sobreiros". *Arquivo Rural*. 36 297-298.
- Campos, P.; Daly-Hassen, H.; Oviedo, J.L. *et al.* (2008). "Accounting for single and aggregated forest incomes: Application to public cork oak forests in Jerez (Spain) and Iteimia (Tunisia)". *Ecological Economics*. 65 76-86.
- Caporaso, J.G.; Kuczynski, J.; Stombaugh, J. *et al.* (2010). "QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data". *Nature Methods*. 7 335-336.
- Casamayor, E.O.; Massana, R.; Benlloch, S. *et al.* (2002). "Changes in archaeal, bacterial and eukaryal assemblages along a salinity gradient by comparison of genetic fingerprinting methods in a multipond solar saltern". *Environmental Microbiology*. 4 (6): 338-348.
- Chandler, D. P.; Fredrickson, J. K. and Brockman, F. J. (1997). "Effect of PCR template concentration on the composition and distribution of total community 16S rDNA clone libraries". *Molecular Ecology*. 6 (5): 475-482.
- Chao, A.; Chazdon, R.L.; Colwell, R.K. *et al.* (2005). "A new statistical approach for assessing similarity of species composition with incidence and abundance data". *Ecology Letters*. 8 148-159.
- Cleary, D.F.R.; Smalla, K.; Mendonça-Hagler, L.C.S. *et al.* (2012). "Assessment of variation in bacterial composition among microhabitats in a mangrove environment using DGGE fingerprints and barcoded pyrosequencing". *PLoS ONE*. 7 (1): 1-8.
- Cobos, J.M.; Montoya, R. and Tuset, J.J. 1993. New damages to the *Quercus* woodlands in Spain. Preliminary evaluation of the possible implication of *Phytophthora cinnamomi*., pp. 163-169. Luisi, N., Lerario, P. & Vannini, A., Bari, Itália.
- Cole, J.R.; Wang, Q.; Cardenas, E. *et al.* (2009). "The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis". *Nucleic Acids Research*. 37 (suppl 1): D141-D145.
- Curl, E.A. and Truelove, B. (1986). "The rhizosphere". Springer-Verlag New York Inc., New York.
- David, T.S.; Henriques, M.O.; Kurz-Besson, C. *et al.* (2007). "Water-use strategies in two co-occurring Mediterranean evergreen oaks: surviving the summer drought". *Tree Physiology*. 27 (6): 793-803.
- Duineveld, B.M.; Rosado, A.S.; van Elsas, J.D. *et al.* (1998). "Analysis of the dynamics of bacterial communities in the rhizosphere of the chrysanthemum via denaturing gradient gel electrophoresis and substrate utilization patterns". *Applied and Environmental Microbiology*. 64 (12): 4950-4957.

- Edgar, R.C. (2010). "Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST". *Bioinformatics*. 26 (19): 2460-2461.
- Edgar, R.C.; Haas, B.J.; Clemente, J.C. *et al.* (2011). "UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection". *Bioinformatics*. 27 (16): 2194-2200.
- Edwards, R.; Rodriguez-Brito, B.; Wegley, L. *et al.* (2006). "Using pyrosequencing to shed light on deep mine microbial ecology". *BioMed Central Genomics*. 7 (1): 57.
- Faria, T.; García-Plazaola, J.I.; Abadía, A. *et al.* (1996). "Diurnal changes in photoprotective mechanisms in leaves of cork oak (*Quercus suber*) during summer". *Tree Physiology*. 16 (1-2): 115-123.
- Faria, T.; Silvério, D.; Breia, E. *et al.* (1998). "Differences in the response of carbon assimilation to summer stress (water deficits, high light and temperature) in four Mediterranean tree species". *Physiologia Plantarum*. 102 (3): 419-428.
- Felsenstein, J. (1989). "PHYLIP - Phylogeny Inference Package (Version 3.2)". *Cladistics*. 5 164-166.
- Foster, R.C. (1988). "Microenvironments of soil microorganisms". *Biology and Fertility of Soils*. 6 (3): 189-203.
- Franklin, R. B. and Mills, A. L. (2003). "Multi-scale variation in spatial heterogeneity for microbial community structure in an eastern Virginia agricultural field". *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Ecology*. 44 (3): 335-346.
- Führer, E. . 1998. Oak decline in central Europe: A synopsis of hypotheses. Vol 247, pp. 7-24. United States Department of Agriculture Forest Service General Technical.
- Fulthorpe, R.R.; Roesch, L.F.W.; Riva, A. *et al.* (2008). "Distantly sampled soils carry few species in common". *International Society for Microbial Ecology Journal*. 2 (9): 901-910.
- Gans, J.; Wolinsky, M. and Dunbar, J. (2005). "Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil". *Science*. 309 (5739): 1387-1390.
- Hadrys, H.; Balick, M. and Schierwater, B. (1992). "Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology". *Molecular Ecology*. 1 (1): 55-63.
- Henriques, I.S.; Alves, A.; Tacão, M. *et al.* (2006). "Seasonal and spatial variability of free-living bacterial community composition along an estuarine gradient (Ria de Aveiro, Portugal)". *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 68 (1–2): 139-148.
- Heuer, H.; Krsek M.; Baker, P. *et al.* (1997). "Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel electrophoretic separation in denaturing gradients". *Appl Environ Microbiol*. 63 3233-3241.

- Hovig, Eivind; Smith-Sørensen, Birgitte; Brøgger, Anton *et al.* (1991). "Constant denaturant gel electrophoresis, a modification of denaturing gradient gel electrophoresis, in mutation detection". *Mutation Research Letters*. 262 (1): 63-71.
- Huson, D.H.; Mitra, S.; Ruscheweyh, H.J. *et al.* (2011). "Integrative analysis of environmental sequences using MEGAN4". *Genome Research*. 21 (9): 1552-1560.
- Ja, K.M.; Han, L.S. and Young, W.S. (2011). "Cork oak (*Quercus suber* L.) forest decline in Tunisia: A linkage between physiological adaptation and stress". *Scientific Research and Essays*. 6 (6): 1143-1146.
- Jensen, S.; Ovreas, L.; Daae, F. L. *et al.* (1998). "Diversity in methane enrichments from agricultural soil revealed by DGGE separation of PCR amplified 16S rDNA fragments". *FEMS microbiology ecology*. 26 (1): 17-26.
- Joffre, R.; Rambal, S. and Ratte, J.P. (1999). "The dehesa system of southern Spain and Portugal as a natural ecosystem mimic". *Agroforestry Systems*. 45 57-79.
- Joynt, J.; Bischoff, M.; Turco, R. *et al.* (2006). "Microbial community analysis of soils contaminated with lead, chromium and petroleum hydrocarbons". *Microbial Ecology*. 51 (2): 209-219.
- Kumar, S.; Carlsen, T.; Mevik, B.H. *et al.* (2011). "CLOTU: An online pipeline for processing and clustering of 454 amplicon reads into OTUs followed by taxonomic annotation". *BioMed Central Bioinformatics*. 12 (1): 182.
- Lane, D J; Pace, B; Olsen, G J *et al.* (1985). "Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses". *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 82 (20): 6955-6959.
- Lauber, C.L.; Strickland, M.S.; Bradford, M.A. *et al.* (2008). "The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types". *Soil Biology and Biochemistry*. 40 (9): 2407-2415.
- Letunic, I. and Bork, P. (2011). "Interactive Tree Of Life v2: online annotation and display of phylogenetic trees made easy". *Nucleic Acids Research*. 39 (suppl 2): W475-W478.
- Liu, W.T.; Marsh, T.L.; Cheng, H. *et al.* (1997). "Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA". *Applied and Environmental Microbiology*. 63 (11): 4516-4522.
- Lombard, N.; Prestat, E.; van Elsas, J.D. *et al.* (2011). "Soil-specific limitations for access and analysis of soil microbial communities by metagenomics". *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Ecology*. no-no.
- López-García, P. and Moreira, D. (2008). "Tracking microbial biodiversity through molecular and genomic ecology". *Research in Microbiology*. 159 (1): 67-73.

- Lugtenberg, B. and Kamilova, F. (2009). "Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria". *Annual Review of Microbiology*. 63 (1): 541-556.
- Lynch, J.M. . (1990). "The Rhizosphere". John Wiley & Sons,
- Maloney, P.E.; van Bruggen, A.H.C. and Hu, S. (1997). "Bacterial community structure in relation to the carbon environments in lettuce and tomato rhizospheres and in bulk soil". *Microbial Ecology*. 34 (2): 109-117.
- Mardis, E.R. (2011). "A decade/'s perspective on DNA sequencing technology". *Nature*. 470 (7333): 198-203.
- Margulies, M.; Egholm, M.; Altman, W.E. *et al.* (2005). "Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors". *Nature*. 437 (7057): 376-380.
- Marschner, P.; Yang, C.H.; Lieberei, R. *et al.* (2001). "Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere". *Soil Biology and Biochemistry*. 33 (11): 1437-1445.
- Maxam, A M and Gilbert, W. (1977). "A new method for sequencing DNA". *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 74 (2): 560-564.
- Mendes, A.M.S.C. 2002. A economia do sector da cortiça em Portugal. Evolução das actividades de produção e de transformação ao longo dos séculos XIX e XX. Faculdade de Economia e Gestão da Universidade Católica Portuguesa, Porto.
- Metzker, M.L. (2010). "Sequencing technologies - the next generation". *Nature Reviews Genetics*. 11 (1): 31-46.
- Meyer, F.; Paarmann, D.; D'Souza, M. *et al.* (2008). "The metagenomics RAST server - a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes". *BioMed Central Bioinformatics*. 9 (1): 386.
- Montero, G. and Cañellas, I. (2003). "The silviculture of cork oak woodlands in Spain". *Silva Lusitana*. 11 (1): 1-19.
- Moreira, A.C.; Caetano, P.; Correia, S. *et al.* 1993. *P. cinnamomi* associated with cork oak decline in southern Portugal. Montréal, Canada.
- Moreira, A.C. and Martins, J.M.S. (2005). "Influence of site factors on the impact of *Phytophthora cinnamomi* in cork oak stands in Portugal". *Forest Pathology*. 35 (3): 145-162.
- Moreira, A.C.; Medeira, C.; Maia, I. *et al.* (2006). "Studies on the association of the *Quercus suber* decline disease with *Phytophthora cinnamomi* in Portugal". *Bol Inf CIDEU*. 1 31-38.
- Morgulis, A.; Gertz, E.M.; Schäffer, A.A. *et al.* (2006). "A fast and symmetric DUST implementation to mask low-complexity DNA sequences.". *Journal of Computational Biology*. 13 (5): 1028.
- Mukerji, K.G.; Manoharachary, C. and Singh, J. (2006). "Microbial activity in the rhizosphere". Springer, Verlag, Berlin, Heidelberg.

- Muyzer, G.; de Waal, E.C. and Uitterlinden, A.G. . (1993). "Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA". *Applied and Environmental Microbiology*. 59 695-700.
- Muyzer, G. and Smalla, K. (1998). "Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology". *Antonie van Leeuwenhoek*. 73 (1): 127-141.
- Myers, Richard M.; Fischer, Stuart G.; Lerman, Leonard S. *et al.* (1985). "Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis". *Nucleic Acids Research*. 13 (9): 3131-3145.
- Nacke, H.; Thürmer, A.; Wollherr, A. *et al.* (2011). "Pyrosequencing-based assessment of bacterial community structure along different management types in German forest and grassland soils". *PLoS ONE*. 6 (2): 1-12.
- Nakatsu, C.H. 2004. "Microbial community analysis". In: *Encyclopedia of soils in the environment*, (ed. DHe *al.*), pp. 455-463. Elsevier, Oxford, UK.
- Nakatsu, C.H. . (2007). "Soil microbial community analysis using denaturing gradient gel electrophoresis". *Soil Science Society of America Journal*. 71 (2): 562-571.
- Ogier, Jean-Claude; Son, Olivier; Gruss, Alexandra *et al.* (2002). "Identification of the Bacterial Microflora in Dairy Products by Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis". *Applied and Environmental Microbiology*. 68 (8): 3691-3701.
- Otieno, D.; Kurz-Besson, C.; Liu, J. *et al.* (2006). "Seasonal variations in soil and plant water status in a *Quercus suber* L. stand: Roots as determinants of tree productivity and survival in the Mediterranean-type ecosystem". *Plant and Soil*. 283 (1): 119-135.
- Pereira, H. . (2007). "Cork: biology, production and uses". Elsevier Science B.V., Amsterdam.
- Pereira, H. and Tomé, M. 2004. "Non-wood products: cork oak". In: *Encyclopedia of Forest Sciences*, (ed. J Burley, J Evans, JA Youngquist), pp. 613–620. Elsevier, Oxford.
- Pereira, J.S.; Bugalho, M.N. and Caldeira, M.C. . (2008). "Do sobreiro à cortiça: Um sistema sustentável".
- Pinto-Correia, T. and Mascarenhas, J. (1999). "Contribution to the extensification/intensification debate: new trends in the Portuguese montado". *Landscape and Urban Planning*. 46 (1–3): 125-131.
- Pruesse, E.; Quast, C.; Knittel, K. *et al.* (2007). "SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB". *Nucleic Acids Research*. 35 (21): 7188-7196.
- Ranjard, L.; Poly, F.; Lata, J.-C. *et al.* (2001). "Characterization of bacterial and fungal soil communities by automated ribosomal intergenic spacer analysis

- fingerprints: Biological and methodological variability". *Applied and Environmental Microbiology*. 67 (10): 4479-4487.
- Ranjard, L.; Poly, F. and Nazaret, S. (2000). "Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment". *Research in Microbiology*. 151 (3): 167-177.
- Roche. (2006). "GS guide to amplicon sequencing".
- Roche. (2008). "GS FLX titanium emPCR method manual".
- Roche. (2009). "Amplicon fusion primer design guidelines for GS FLX titanium series Lib-A chemistry".
- Roesch, L.F.W.; Fulthorpe, R.R.; Riva, A. *et al.* (2007). "Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity". *International Society for Microbial Ecology Journal*. 1 (4): 283-290.
- Ronaghi, M. (2011). "Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing". *Genome Research*. 11 3-11.
- Sanger, F.; Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors". *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 74 (12): 5463-5467.
- Schloss, P.D. and Handelsman, J. (2005). "Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness". *Applied and Environmental Microbiology*. 71 (3): 1501-1506.
- Schloss, P.D. and Handelsman, J. (2006). "Toward a census of bacteria in soil". *PLoS Computational Biology*. 2 (7): 786-793.
- Schloss, P.D.; Westcott, S.L.; Ryabin, T. *et al.* (2009). "Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities". *Applied and Environmental Microbiology*. 75 (23): 7537-7541.
- Seifert, K.A. (2008). "Integrating DNA barcoding into the mycological sciences". *Persoonia*. 21 162-166.
- Semenov, A.M.; van Bruggen, A.H.C. and Zelenev, V.V. (1999). "Moving waves of bacterial populations and total organic carbon along roots of wheat". *Microbial Ecology*. 37 (2): 116-128.
- Sheffield, V C; Cox, D R; Lerman, L S *et al.* (1989). "Attachment of a 40-base-pair G + C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes". *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 86 (1): 232-236.
- Singh, B.K.; Munro, S.; Potts, J.M. *et al.* (2007). "Influence of grass species and soil type on rhizosphere microbial community structure in grassland soils". *Applied Soil Ecology*. 36 (2-3): 147-155.

- Siqueira, J.F.; Fouad, A.F. and Rocas, I.N. (2012). "Pyrosequencing as a tool for better understanding of human microbiomes". *J Oral Microbiol.* 4
- Sogin, M.L.; Morrison, H.G.; Huber, J.A. *et al.* (2006). "Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere"". *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 103 (32): 12115-12120.
- Sørensen, J. 1997. "The rhizosphere as a habitat for soil microorganisms". In: *Modern Soil Microbiology*, (ed. J van Elsas, J Trevors, E Wellington), pp. 21-45. Marcel Dekker, New York.
- Stackebrandt, E. and Goebel, B.M. (1994). "Taxonomic note: A place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology". *International Journal of Systematic Bacteriology.* 44 (4): 846-849.
- Staley, J.T. and Konopka, A. (1985). "Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats". *Annual Review of Microbiology.* 39 (1): 321-346.
- Sun, H.Y.; Deng, S.P. and Raun, W.R. (2004). "Bacterial community structure and diversity in a century-old manure-treated agroecosystem". *Applied and Environmental Microbiology.* 70 (10): 5868-5874.
- Thomas, F.M.; Blank, R. and Hartmann, G. (2002). "Abiotic and biotic factors and their interactions as causes of oak decline in Central Europe". *Forest Pathology.* 32 (4-5): 277-307.
- Torsvik, V.; Goksoyr, J. and Daae, F.L. (1990). "High diversity in DNA of soil bacteria". *Applied and Environmental Microbiology.* 56 (3): 782-787.
- Tuset, J.J.; Hinarejos, C.; Mira, J.L. *et al.* (1996). "Implicación de *Phytophthora cinnamomi* Rands en la enfermedad de la "seca" de encinas y alcornoques". *Boletín de Sanidad Vegetal.* 22 491-499.
- Uroz, S.; Buée, M.; Murat, C. *et al.* (2010). "Pyrosequencing reveals a contrasted bacterial diversity between oak rhizosphere and surrounding soil". *Environmental Microbiology Reports.* 2 (2): 281-288.
- White, J.R. ; Arze, C.; Matalka, M. *et al.* (2011). "CloVR-16S: Phylogenetic microbial community composition analysis based on 16S ribosomal RNA amplicon sequencing – standard operating procedure, version 1.0 ". *Nature Precedings.*
- White, J.R.; Nagarajan, N. and Pop, M. (2009). "Statistical methods for detecting differentially abundant features in clinical metagenomic samples". *PLoS Computational Biology.* 5 (4): e1000352.
- Yergeau, E.; Bezemer, T.M.; Hedlund, K. *et al.* (2010). "Influences of space, soil, nematodes and plants on microbial community composition of chalk grassland soils". *Environmental Microbiology.* 12 (8): 2096-2106.

6 ANEXOS

Tabela 10. Sequências dos “primers” para a região V6 utilizados para a construção da biblioteca de amplicões na pirosequenciação. A vermelho estão indicadas as sequências dos adaptadores; a azul as sequências chave para controlo interno da sequenciação; a verde as sequências identificadoras; e a preto a zona de reconhecido da região a amplificar.

Amostra	Primer ID	Sequência (Adaptador; Chave; Identificação; Primer)
1.1S	>tit_V6_F6	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTCGCACAGATGCAACGCGAAGAACCT
1.2S	>tit_V6_F6	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTCGCACAGATGCAACGCGAAGAACCT
1.3S	>tit_V6_F6	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTCGCACAGATGCAACGCGAAGAACCT
3.1S	>tit_V6_F7	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCGAGCATCATGCAACGCGAAGAACCT
3.2S	>tit_V6_F7	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCGAGCATCATGCAACGCGAAGAACCT
3.3S	>tit_V6_F7	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCGAGCATCATGCAACGCGAAGAACCT
5.1S	>tit_V6_F8	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTGATATATATGCAACGCGAAGAACCT
5.2S	>tit_V6_F8	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTGATATATATGCAACGCGAAGAACCT
5.3S	>tit_V6_F8	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTGATATATATGCAACGCGAAGAACCT
9.1S	>tit_V6_F9	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCTCGACATATGCAACGCGAAGAACCT
9.2S	>tit_V6_F9	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCTCGACATATGCAACGCGAAGAACCT
9.3S	>tit_V6_F9	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCTCGACATATGCAACGCGAAGAACCT
15.1S	>tit_V6_F10	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCAGTGCTGATGCAACGCGAAGAACCT
15.2S	>tit_V6_F10	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCAGTGCTGATGCAACGCGAAGAACCT
15.3S	>tit_V6_F10	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCAGTGCTGATGCAACGCGAAGAACCT
17.1S	>tit_V6_F11	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGACGTCGACATGCAACGCGAAGAACCT
17.2S	>tit_V6_F11	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGACGTCGACATGCAACGCGAAGAACCT
17.3S	>tit_V6_F11	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGACGTCGACATGCAACGCGAAGAACCT
4.1D	>tit_V6_F12	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGATATGACGATGCAACGCGAAGAACCT
4.2D	>tit_V6_F12	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGATATGACGATGCAACGCGAAGAACCT
4.3D	>tit_V6_F12	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGATATGACGATGCAACGCGAAGAACCT
6.1D	>tit_V6_F13	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAGTAGATCATGCAACGCGAAGAACCT
6.2D	>tit_V6_F13	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAGTAGATCATGCAACGCGAAGAACCT
6.3D	>tit_V6_F13	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAGTAGATCATGCAACGCGAAGAACCT
8.1D	>tit_V6_F14	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAGACTATGATGCAACGCGAAGAACCT
8.2D	>tit_V6_F14	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAGACTATGATGCAACGCGAAGAACCT
8.3D	>tit_V6_F14	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAGACTATGATGCAACGCGAAGAACCT
12.1D	>tit_V6_F15	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCTACAGCTATGCAACGCGAAGAACCT
12.2D	>tit_V6_F15	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCTACAGCTATGCAACGCGAAGAACCT
12.3D	>tit_V6_F15	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCTACAGCTATGCAACGCGAAGAACCT
14.1D	>tit_V6_F16	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTATGAGATATGCAACGCGAAGAACCT
14.2D	>tit_V6_F16	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTATGAGATATGCAACGCGAAGAACCT
14.3D	>tit_V6_F16	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTATGAGATATGCAACGCGAAGAACCT
16.1D	>tit_V6_F17	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTACGCTACATGCAACGCGAAGAACCT
16.2D	>tit_V6_F17	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTACGCTACATGCAACGCGAAGAACCT
16.3D	>tit_V6_F17	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTACGCTACATGCAACGCGAAGAACCT

Tabela 11. Sequências dos “primers” para a região ITS II utilizados para a construção da biblioteca de amplicões na pirosequenciação. A vermelho estão indicadas as sequências dos adaptadores; a azul as sequências chave para controlo interno da sequenciação; a verde as sequências identificadoras; e a preto a zona de reconhecido da região a amplificar.

Amostra	Primer ID	Sequência (Adaptador; Chave; Identificação; Primer)
1.1S	>tit_ITS2_F6	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCGTATGCAGCATCGATGAAGAACGC
1.2S	>tit_ITS2_F6	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCGTATGCAGCATCGATGAAGAACGC
1.3S	>tit_ITS2_F6	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCGTATGCAGCATCGATGAAGAACGC
3.1S	>tit_ITS2_F7	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAGTGACGAGCATCGATGAAGAACGC
3.2S	>tit_ITS2_F7	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAGTGACGAGCATCGATGAAGAACGC
3.3S	>tit_ITS2_F7	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAGTGACGAGCATCGATGAAGAACGC
5.1S	>tit_ITS2_F8	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTAGCGTCTGCATCGATGAAGAACGC
5.2S	>tit_ITS2_F8	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTAGCGTCTGCATCGATGAAGAACGC
5.3S	>tit_ITS2_F8	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTAGCGTCTGCATCGATGAAGAACGC
9.1S	>tit_ITS2_F9	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGACACGCTAGCATCGATGAAGAACGC
9.2S	>tit_ITS2_F9	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGACACGCTAGCATCGATGAAGAACGC
9.3S	>tit_ITS2_F9	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGACACGCTAGCATCGATGAAGAACGC
15.1S	>tit_ITS2_F10	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGATGCTAGAGCATCGATGAAGAACGC
15.2S	>tit_ITS2_F10	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGATGCTAGAGCATCGATGAAGAACGC
15.3S	>tit_ITS2_F10	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGATGCTAGAGCATCGATGAAGAACGC
17.1S	>tit_ITS2_F11	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCGACTCGTGCATCGATGAAGAACGC
17.2S	>tit_ITS2_F11	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCGACTCGTGCATCGATGAAGAACGC
17.3S	>tit_ITS2_F11	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCGACTCGTGCATCGATGAAGAACGC
4.1D	>tit_ITS2_F12	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCACAGTGAGCATCGATGAAGAACGC
4.2D	>tit_ITS2_F12	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCACAGTGAGCATCGATGAAGAACGC
4.3D	>tit_ITS2_F12	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCACAGTGAGCATCGATGAAGAACGC
6.1D	>tit_ITS2_F13	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTCAGCTGTGCATCGATGAAGAACGC
6.2D	>tit_ITS2_F13	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTCAGCTGTGCATCGATGAAGAACGC
6.3D	>tit_ITS2_F13	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTCAGCTGTGCATCGATGAAGAACGC
8.1D	>tit_ITS2_F14	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTATGCAGAGCATCGATGAAGAACGC
8.2D	>tit_ITS2_F14	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTATGCAGAGCATCGATGAAGAACGC
8.3D	>tit_ITS2_F14	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTATGCAGAGCATCGATGAAGAACGC
12.1D	>tit_ITS2_F15	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGATGTACTAGCATCGATGAAGAACGC
12.2D	>tit_ITS2_F15	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGATGTACTAGCATCGATGAAGAACGC
12.3D	>tit_ITS2_F15	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGATGTACTAGCATCGATGAAGAACGC
14.1D	>tit_ITS2_F16	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTGTCTGTGAGCATCGATGAAGAACGC
14.2D	>tit_ITS2_F16	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTGTCTGTGAGCATCGATGAAGAACGC
14.3D	>tit_ITS2_F16	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTGTCTGTGAGCATCGATGAAGAACGC
16.1D	>tit_ITS2_F17	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCGATCTGAGCATCGATGAAGAACGC
16.2D	>tit_ITS2_F17	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCGATCTGAGCATCGATGAAGAACGC
16.3D	>tit_ITS2_F17	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCGATCTGAGCATCGATGAAGAACGC